

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Kwartalnik

Tom 54

Zeszyt 4•2015

PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:

PMKMAV 54 (4)

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 RÓŻAŁSKI (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 17 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

Podziękowania

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* serdecznie dziękuje naszym Recenzentom
spoza Rady Redakcyjnej:

Pani Dr Tamarze Aleksandrak-Piekarczyk

Pani Prof. Ewie Augustynowicz-Kopeć

Panu Prof. Waldemarowi Dąbrowskiemu

Pani Prof. Marii Doligalskiej

Panu Prof. Janowi Grajewskiemu

Panu Prof. n. farm. Wiesławowi Kurzątkowskiemu

Pani Prof. Bogumile Litwińskiej

Panu Dr. Antoniemu Miernikowi

Panu Dr. hab. Andrzejowi Młynarczykowi

Pani Dr Joannie Stefańskiej

Panu Prof. Stefanowi Tyskiemu

Pani Dr Marcie Wrzosek

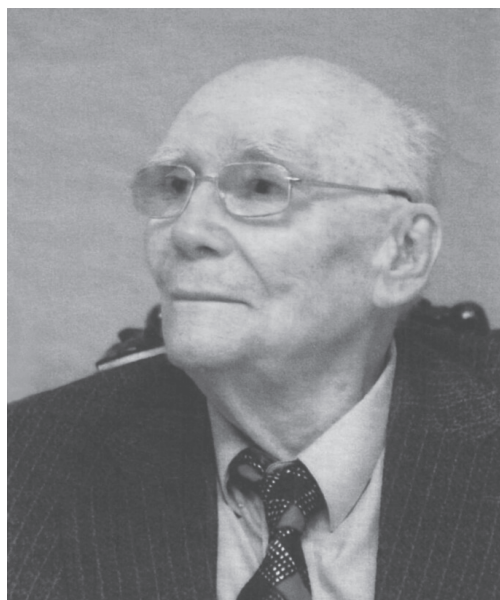
WSPOMNIENIE

Prof. zw. dr hab. Zdzisław Larski (1919–2015)

*Życie rodzi życie.
Energia stwarza energię.
Rozdając siebie,
człowiek się wzbogaca.*
Sarah Bernhardt

W dniu 15.04.2015 r. zmarł Zdzisław Larski, profesor zwyczajny, wybitny uczony, człowiek wielkiego ducha, entuzjasta i pasjonat nauki, kochający służyć radą i pomocą tym, którzy tego potrzebowali, w tym pracownikom naukowym i nauczycielom akademickim, ale także lekarzom. Odszedł wielki badacz i nestor polskiej mikrobiologii, wirusologii i immunologii, który przyczynił się do promocji wielu profesorów i doktorów habilitowanych w Polsce z zakresu mikrobiologii weterynaryjnej, a także medycznej poprzez recenzje dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego. Wśród tych promowanych pracowników naukowych, którzy tworzyli i tworzą fundamenty mikrobiologii w Polsce należy wymienić m.in. prof. zw. dr hab. Janusza Wawrzekiewicza, prof. zw. dr hab. Jana Buczka, prof. zw. dr hab. Jerzego Kitę, prof. zw. dr hab. Wandę Borzemską, prof. dr hab. Henryka Lisa, prof. dr hab. Irenę Janowską, prof. dr hab. Jerzego Wiśniewskiego, prof. dr hab. płk Michała Bartoszcze, prof. dr hab. Elżbietę Samorek-Salamonowicz, prof. dr hab. Martynę Kandafer-Szerszeń oraz prof. dr hab. Wiesława Deptułę. Prof. zw. dr hab. Zdzisław Larski był formalnie promotorem 7 prac doktorskich oraz tylu samo postępowań habilitacyjnych, spośród których w zasadzie wszyscy doktorzy habilitowani uzyskali tytuł profesora.

Prof. zw. dr hab. Zdzisław Larski urodził się 5 stycznia 1919 r. w Rzeszowie. Tam też ukończył słynne Staroklasyczne Gimnazjum im. Stanisława Konarskiego. Zaraz po zdaniu egzaminu dojrzałości (1937 r.) zgłosił się ochotniczo do Szkoły Podchorążych Artylerii we Włodzimierzu Wołyńskim i po jej ukończeniu z wysoką lokatą, odbył „praktykę” jako plutonowy podchorąży w 24 Pułku Artylerii Lekkiej w Jarosławiu. Warto dodać, że w czasie szkoły średniej Profesor był wybijającym się szermierzem i odniósł dość znaczne sukcesy w tej dyscyplinie. Z końcem sierpnia 1938 roku został zwolniony z wojska do rezerwy. Następnie



w latach 1938–1939 studiuje na Wydziale Chemicznym Politechniki Lwowskiej, ale studia przerwała wojna.

W dniu 03.09.1939 roku został zmobilizowany i skierowany jako wojskowy do Jarosławia. Następnie 16.09.1939 roku jest wzięty do niewoli przez Niemców i przebywa w Rawie Ruskiej, Lubaczowie, Jarosławiu i Łobzowie. Po zwolnieniu wraca do Niechóbrza koło Rzeszowa, gdzie wcześniej zamieszkiwali Jego Rodzice.

Podczas okupacji niemieckiej, w 1942 roku rozpoczyna studia w Akademii Medycyny Weterynaryjnej (AMW) we Lwowie, które kontynuuje do 1944 r., kończąc 3 rok studiów w czasie których nauczycielami akademickimi byli pracownicy przedwojennej AMW z Lwowa m.in.: A. Bant, A. Klisiecki, W. Herman, G. Poluszyński, K. Szczudłowski, A. Zakrzewski i K. Łopatyński. W trakcie tej edukacji Profesor ze względu na swoje studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Lwowskiej, był również asystentem

– wolontariuszem w Zakładzie Chemii Ogólnej u prof. Wacława Moraczewskiego. Po wojnie w okresie od 2 II 1946 do 7 IV 1947 r. kontynuuje studia weterynaryjne we Wrocławiu, gdzie na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu i Politechniki Wrocławskiej, otrzymuje dnia 12 kwietnia 1947 roku, dyplom lekarza weterynarii pełniąc równocześnie w czasie studiów obowiązki asystenta w Zakładzie Fizjologii Wydziału Lekarskiego u prof. Klisieckiego. W czasie studiów weterynaryjnych (Lwów, krótko Kraków i Lublin oraz Wrocław), był wybijającym się studentem, jako że na 29 egzaminów, 25 zdał celująco. Warto dodać, że Profesor w czasie kiedy chciał dokończyć rozpoczęte studia weterynaryjne we Lwowie, po wojnie w Polsce, był krótko na nowopowstałej i rozwiązanej weterynarii na UJ w Krakowie i na weterynarii na UMCS w Lublinie (zdał tutaj egzamin z interny), by następnie dokończyć studia we Wrocławiu.

Po studiach Profesor w latach 1947–1949 pracował na stanowisku terenowego lekarza weterynarii w Toszku, powiat Gliwice, a od 01.XI.1949 roku podjął pracę jako pracownik naukowy (asystent) w Wojewódzkim Zakładzie Higieny Weterynaryjnej (WZHW) we Wrocławiu. W styczniu 1951 roku Profesor przechodzi służbowo do WZHW Opolą, który to zakład, tak jak WZHW Wrocław, podlegał i był integralną częścią Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (PIW) w Puławach – pracując w Opolu na stanowisku adiunkta. Następnie w roku 1953 Profesor przenosi się do Ośrodka Badań nad Chorobą Cieszyńską Świń w Gumnej k. Cieszyna na stanowisko kierownika tej jednostki badawczej, jako że w międzyczasie odbył m.in. staż w Katedrze Mikrobiologii AM Kraków u prof. Legeżyńskiego i ukończył kurs wirusologii dla zaawansowanych w PZH w Warszawie oraz kurs z zakresu „hodowli wirusów” w Instytucie Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdańsku u prof. Morzyckiego. Pracując w Opolu (1951–1952) był także wykładowcą mikrobiologii i chemii fizycznej w Pomaturalnej Szkole Felczerskiej Ministra Zdrowia w tym mieście. Pracując w Gumnej w 1958 roku po pozytywnej obronie dysertacji doktorskiej pt. „Namnażanie wirusa choroby cieszyńskich świń w hodowlach tkankowych z uwzględnieniem jego własności uodporniających” uzyskał stopień naukowy kandydata nauk weterynaryjnych na Wydziale Weterynaryjnym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. W roku 1959 służbowo przeniesiono na życzenie Profesora, z Gumnej do PIW w Puławach, gdzie pracuje do 30.VII.1967. W Puławach rozpoczyna pracę na stanowisku kierownika zorganizowanej przez siebie Samodzielnej Pracowni Wirusologii Ogólnej. W 1961 roku odbywa staż naukowy w Instytucie Wistara w Filadelfii (USA), jako stypendysta Fundacji Rockefellera i mimo, że nie spełniło się jego marzenie pobytu w USA, bo miał pracować nad biochemią wirusów, wrócił z ogrom-

nym potencjałem badawczym i wiedzą. Po powrocie ze stażu wykonuje na zlecenie Ministerstwa Rolnictwa USA, 3-letnie badania dotyczące właściwości immunogennych, tropizmu i zjadliwości wirusa choroby Newcastle (NDV) i w dowód uznania za wykonane badania otrzymuje stypendium i wyjeżdża na staż i konsultacje do Niemiec (Tübinga – Instytut Maxa Plancka, Monachium – Uniwersytet Monachium Wydz. Wet. – prof. Meyer, prof. Gylstorf), Włoch (Perugia – prof. Castrucci) i Austrii. W czasie tego pobytu konsultuje swoje wyniki z zakresu wirusa choroby cieszyńskiej i wirusa polio oraz wirusa NDV.

Stopień doktora habilitowanego nauk weterynaryjnych uzyskał w 1962 roku na Wydziale Weterynaryjnym Akademii Rolniczej we Wrocławiu, jako że już przed wyjazdem do USA miał napisaną pracę habilitacyjną. Z dniem 1 lipca 1967 roku przeniesiony jest służbowo przez Ministra Oświaty i Szkolnictwa Wyższego z Puław do Olsztyna, gdzie tworzył się nowy Wydział Weterynaryjny w Wyższej Szkole Rolniczej (WSR) (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski UWM), w której objął stanowisko kierownika Katedry Mikrobiologii Weterynaryjnej, którą stworzył na bazie Katedry Mikrobiologii Rybackiej pozostałej po profesorze Zalewskim. Tytuł profesora nadzwyczajnego otrzymał w 1969 roku, a profesora zwyczajnego ze względu na swój światopogląd dopiero w 1979 roku. W czasie swojej pracy na Wydziale Wet. Akademii Rolniczo-Technicznej (AR-T) (obecnie Wydział Medycyny Weterynaryjnej – UWM), był Tym, dzięki Któremu ośrodek naukowy w Olsztynie był najbogatszym w Polsce pod względem m.in. światowych podręczników i czasopism z zakresu weterynarii, w tym mikrobiologii, immunologii i immunobiologii.

Główne kierunki działalności naukowej profesora Zdzisława Larskiego to wirusologia, a w szczególności wirus choroby cieszyńskiej, którego był „odkrywcą” (był pierwszym w świecie, który wyhodował tego wirusa z hodowli tkankowej i miał światowy priorytet w uzyskaniu z namnażaniem w hodowli tkankowej tego wirusa, jako że w tym zakresie Profesor wyprzedził o rok wirusologów niemieckich i francuskich i o 2 lata czeskich; wirus polio (pracując w USA), a także wirus choroby Newcastle (NDV), choć także Profesor zajmował się badaniami dotyczącymi zmienności i izolacji wirusów otoczkowych, chemioterapii zakażeń wirusowych – głównie herpeswirusów u zwierząt (IBR/IPV) i ludzi (HSV1, HSV2) oraz odporności przeciwwirusowej (m.in. związanej z interferonem), w tym w szczególności wirusa parainfluenzy-3 i wirusa NDV. Także wręcz gorliwie zajmował się immunologią głównie odpornością naturalną, w tym najbardziej aktualnymi zagadnieniami dotyczącymi odporności zakażeń wirusowych oraz immunologii ogólnej, w tym terminologii immunologicznej.

W swoim dorobku naukowym Prof. zw. dr hab. Zdzisław Larski posiada 320 publikacji m.in. w takich czasopismach zagranicznych jak *Bull. Office International des Epizooties* (Francja), *Acta Virologica* (Czechosłowacja), *Adv. Vet. Sci.* (Anglia), *Principles of Bacteriology and Immunity* (USA) oraz polskich takich jak: *Pol. Arch. Wet., Post. Hig. i Med. Dośw., Postępy Mikrobiologii czy Medycyna Wet.*, w tym 10 książek, z których „Wirusologia weterynaryjna” – 3 wydania (1965, 1975 i 1982) oraz „Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt” – 3 wydania (1968, 1977, 1992), były tłumaczone na język angielski, hiszpański, rosyjski, bułgarski i węgierski, a monografia pt. „Choroba cieszyńska świń” współautorstwa z prof. J. Szaflarskim była pierwszym opracowaniem tego typu w Europie. Nadto był autorem rozdziału o wirusach świń w „International Encyclopedia of Veterinary Medicine” W. Green, San Ltd, London 1966 r. oraz trzech rozdziałów o chorobach świń w dwóch wydaniach podręcznika „Choroby świń” red. Prof. H. Janowski, PWRiL, 1971. Był także redaktorem naukowym przekładu zbiorowego książki z języka niemieckiego pt. „Infektionskrankheiten der Haustiere”. Warto dodać, że Profesor jest jedynym Autorem wśród uczonych z Polski, z zakresu mikrobiologii, którego książka Jego autorstwa pt. „Wirusologia weterynaryjna” na zaproszenie National Science Foundation w Waszyngtonie była na rynku USA (*Veterinary Virology* – 1980), a na zaproszenie Prensa Medica Mexicana (*Virologia para Veterinarios* – 1989) znalazła się także w krajach posługujących się językiem hiszpańskim. Zatem pozycja ta w pełni gościła na rynku USA i Ameryki Południowej.

Prof. zw. dr hab. Zdzisław Larski był uczestnikiem i referentem na wielu konferencjach zagranicznych (Francja, Czechosłowacja, Turcja, USA, Węgry, Włochy, Austria, RFN), prezentując dane z zakresu wirusologii i immunologii. Był także wykładowcą z zakresu wirusologii na kursach dla obcokrajowców zorganizowanych w Polsce przez FAO. Profesor był także współautorem z prof. M. Truszczyńskim fundamentalnego podręcznika do nauki mikrobiologii dla studentów wydziałów weterynaryjnych w Polsce pt. „Zarys mikrobiologii weterynaryjnej” wydanego przez PWRiL w 1983 i wydanego przez AR-T w Olsztynie w 1992. Będąc na emeryturze był współautorem skryptu pt. „Immunologia dla studentów weterynarii” wydanego przez UWM, Olsztyn 2001. Profesor był również recenzentem 53 podręczników i skryptów wydanych w Polsce z zakresu mikrobiologii, wirusologii i immunologii, w tym podręcznika z zakresu immunologii prof. W. Ptaka – legendy immunologii europejskiej.

W latach 1976–1981 był członkiem Komisji Wirusologicznej PAN, pełniąc funkcję Przewodniczącego. Pełnił także funkcję członka honorowego Prezydium Komitetu Nauk Weterynaryjnych, Wydziału II Nauk

Biologicznych i Rolniczych PAN oraz Wydziału V Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN, a także był członkiem honorowym Komitetu Mikrobiologii, Wydziału II Nauk Biologicznych i Rolniczych PAN oraz Komitetu Nauk Weterynaryjnych tegoż Wydziału PAN. W roku 1992 otrzymał honorowe członkostwo Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych oraz w 1997 Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Brał także udział w pracach Rady Naukowej Wojskowego Ośrodka Badawczego Służb Weterynaryjnych, Zespołu Dydaktycznego MNiSzWiT – bo był m.in. autorem obowiązującego programu z zakresu mikrobiologii na wydziałach weterynaryjnych w Polsce, jako że realizując dezyderaty Komisji Wirusologicznej PAN wprowadził do dydaktyki mikrobiologicznej pełny kurs wykładów i ćwiczeń z wirusologii. Pracował w Komitecie Redakcyjnym *Polskiego Archiwum Weterynaryjnego* (obecnie *Pol. J. Vet. Sci.*) oraz był długoletnim członkiem Rady Redakcyjnej *Medycyny Weterynaryjnej*. Był członkiem wielu organów Szkoły w której pracował (WSR, AR-T) m.in. był Przewodniczącym Rady Bibliotecznej, Wicedyrektorem Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR-T, choć także po części jest współtwórcą mikrobiologii w Uniwersytecie Szczecińskim. Był także oficerem rezerwy w stopniu podporucznika oraz członkiem PTTK i LOK.

Do końca swojego życia był aktywny, jako iż mimo, że od roku 1989 r. był emerytowanym profesorem, nie przerwał swojej działalności naukowej i edukacyjnej, bo opublikował w tym czasie ponad 100 prac przeglądowych, głównie w *Medycynie Weterynaryjnej*. Ostatnia Jego praca z zakresu wirusologii i immunologii ukazała się w 2015 roku w lutowym numerze tego czasopisma. Opublikowane prace były nie tylko kierunkowskazem w badaniach podstawowych dla badaczy z zakresu nauk biologicznych, weterynaryjnych i medycznych, ale stanowiły one natchnienie także dla wielu innych pracowników naukowych, w tym Jego wychowanków pracujących w nauce, bo między innymi dzięki tym pracom powstawały pierwsze prace w Polsce na temat m.in. odporności przy prionach, zjawiska NET, komórek ILC (innate lymphoid cells), czy prace o mało znanych wirusach olbrzymich, jak też o rewelacyjnych „istotach biologicznych” jakimi są wirofagi – „pasożyty” wirusów. Za wybitne osiągnięcia naukowe i dydaktyczne został odznaczony Krzyżem Kawalerskim (1974), Krzyżem Oficerskim (1998), Krzyżem Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski (2002), Medalem 40-lecia Polski Ludowej, Medalem Komisji Edukacji Narodowej (1981), Medalem Pro Scientia Vet. Polona (1984), a także nagrodami Ministra Rolnictwa (1955 i 1987) oraz Ministra związanego z Nauką (1969, 1976, 1978, 1984 i 1989). Był odbiorcą wielu dyplomów, wyróżnień i nagród, nadawanych m.in. przez Polskie Tow. Nauk Wet. czy Pol. Tow. Mikrobiologów oraz inne instytucje

państwowe jako że był m.in. odznaczony Złotą odznaką „Zasłużony dla Warmii i Mazur” (1974) oraz Srebrnym i Brązowym medalem „Za zasługi dla obronności kraju” (1976), jak też medalem „Zasłużony Pracownik Rolnictwa” (1980), medalem „Zasłużony Nauczyciel PRL”, medalem „XXX-lecia AR-T” (1980), jak też medalem „Za zasługi dla rozwoju WAM”.

Był człowiekiem hojnym i serdecznym dla ludzi nauki, ale także krytycznym recenzentem, w tym osiągnięć własnych i innych, a także krytykiem działań ludzi mało wrażliwych na życie i dobro innego człowieka przez co mógł być postrzegany, nie tylko jako wybitny badacz i uczony oraz wspaniały nauczyciel akademicki, ale także jako bezkompromisowy człowiek.

Prof. zw. dr hab. Zdzisław Larski spoczął w dniu 18.04.2015 na cmentarzu przy ulicy Poprzecznej w Olsztynie i był żegnany przez wielu pracowników nauki z całej Polski, w tym UWM w Olsztynie, wśród których byli Jego dawni współpracownicy oraz w odświeżonym akademickim stroju J.M. Rektor, Prorektorzy i Senat UWM, a także Dziekan i Prodziekan oraz członkowie Wysokiej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej tego Uniwersytetu.

Szanowny Panie Profesorze pozostaniesz w naszych sercach i pamięci na zawsze!

Prof. dr hab. Wiesław Deptuła
Prof. dr hab. Andrzej Krzysztof Siwicki

Izabela Korona-Główniak^{1*}, Anna Malm¹

Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Wpłynęło w grudniu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Kolonizacja nosogardłowa przez *Streptococcus pneumoniae* jako prekursor choroby. 3. Czynniki chorobotwórczości *S. pneumoniae* i ich znaczenie w patogenezie zakażeń. 4. Patogeneza zakażenia pneumokokowego. 5. Odporność przeciwpneumokokowa gospodarza. 6. Profilaktyka zakażeń pneumokokowych. 7. Podsumowanie

***Streptococcus pneumoniae* – colonization and pneumococcal disease**

Abstract: *Streptococcus pneumoniae* is a major cause of morbidity and mortality worldwide, especially in young children and elderly people. Pneumococcus is the leading cause of non-invasive (pneumonia, sinusitis, otitis media) and invasive (meningitis and bacteremia/sepsis) pneumococcal disease. The virulence of *S. pneumoniae* is dependent on numerous factors. Nasopharyngeal carriage of pneumococcus precedes disease and is the source of pneumococcal spread in the community. Although the relationship between carriage and disease is not well understood, a lot of data suggest that local or invasive infection is caused by serotypes which previously bind to the epithelial surface within the respiratory tract. Pneumococcal conjugate vaccines effectively prevent the most serious forms of pneumococcal disease caused by serotypes included in the vaccines and also reduce the risk of nasopharyngeal carriage by those serotypes. Recently, studies were carried out on the immunogenicity and significance of numerous protein virulence factors for the induction of serotype-independent protection against pneumococcal infection.

1. Introduction. 2. Nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* as disease precursor. 3. Virulence factors of *Streptococcus pneumoniae* and their impact on the development of pneumococcal disease. 4. Pathogenesis of pneumococcal disease. 5. Antipneumococcal host immunity. 6. Pneumococcal vaccines. 7. Summary

Słowa kluczowe: choroba pneumokokowa, czynniki wirulencji, nosicielstwo, *Streptococcus pneumoniae*, szczepionki

Key words: carriage, pneumococcal disease, *Streptococcus pneumoniae*, virulence factors, vaccines

1. Wstęp

Streptococcus pneumoniae jest jedną z najczęstszych przyczyn zachorowań i śmiertelności dzieci na świecie. Ponad 30 różnych jednostek chorobowych może być związanych z chorobą pneumokokową, jednak z klinicznego punktu widzenia najważniejsze znaczenie mają poważne inwazyjne zakażenia, takie jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, bakteremia/posocznica, zapalenie płuc z bakteriami, określane mianem Inwazyjnej Choroby Pneumokokowej (IChP). Do miejscowych infekcji o charakterze nieinwazyjnym wywołanych przez pneumokoki należą zapalenie ucha środkowego, zatok obocznych nosa oraz zapalenie płuc. Zakażenia te chociaż nie zagrażają życiu bezpośrednio, mogą powodować ciężkie i chroniczne powikłania, stanowiąc jeden z głównych problemów zdrowia publicznego na świecie [2, 17].

Globalna liczba przypadków choroby pneumokokowej u dzieci do 5 roku życia jest szacowana na 14,5 mln rocznie, z których ponad 800 tys. kończy się śmiercią [59]. Najwyższa zachorowalność i śmiertelność (90% zgonów) dzieci w wyniku choroby pneumokokowej dotyczy krajów rozwijających się, głównie Afryki i Azji

Południowo-Wschodniej. W Stanach Zjednoczonych ocenia się, że pneumokoki odpowiedzialne są za 3 tys. przypadków zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, 34 tys. przypadków bakteriemii, 175 tys. przypadków zapalenia płuc i 7 mln przypadków zapaleń ucha środkowego rocznie. Z powodu IChP umiera tam rocznie 5 tys. osób [64]. W Europie notuje się co roku około 260 tys. zachorowań o etiologii pneumokokowej u dzieci poniżej 5 roku życia, z których około 15 tys. kończy się śmiercią [59]. W Polsce dopiero w 2005 roku po raz pierwszy do rejestracji zachorowań prowadzonej przez Zakład Epidemiologii PZH została włączona inwazyjna choroba wywołana przez *S. pneumoniae*: zapalenie opon i/lub mózgu (B95.3/G04.2; G00.1), posocznica (A40.3), zapalenie płuc (J13), inna określona i nie określona (B95.3). W 2005 roku zgłoszono 176 przypadków IChP, w tym 111 to zapalenia opon i/lub mózgu; w 2006 roku zostało zgłoszonych 210 przypadków ogółem, w tym 116 to zapalenia opon i/lub mózgu, natomiast w latach 2010, 2011 i 2012 zostało zgłoszonych odpowiednio 364, 430 i 359 przypadków pneumokokowej choroby inwazyjnej (IPD) (zapadalność na 100 tys. osób odpowiednio 0,95, 1,12 i 0,93), włączając 180, 192 i 140 przypadki zapalenia opon

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin; e-mail: iza.glowniak@umlub.pl

i/lub mózgu. Dane te podawane są z zastrzeżeniem, że są niepełne, ale wzrastająca z roku na rok liczba rejestrowanych zachorowań, prawdopodobnie świadczy, że coraz więcej przypadków jest zgłaszanych [52]. Badania Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN) wskazują, że w 2010 roku najwyższą zapadalność na IChP zanotowano u dzieci do 5. roku życia (3,43/100 000), w tym zwłaszcza u dzieci do 2. roku życia (5,17/100 000), jak również u osób w wieku powyżej 60. roku życia (1,37/100 000) [81].

2. Kolonizacja nosogardłowa przez *Streptococcus pneumoniae* jako prekursor choroby

Głównym naturalnym rezerwuarem *S. pneumoniae* jest człowiek. Pomiędzy poszczególnymi osobami bakterie są przenoszone drogą kontaktu bezpośredniego oraz drogą powietrzno-kropelkową. Częstość nosicielstwa jest największa u małych dzieci. Najwyższą częstość kolonizacji pneumokokami obserwuje się u dzieci do lat 5 (35–60%); stopniowo maleje ona z wiekiem. U dzieci ze szkół podstawowych częstość kolonizacji wynosi 29–35%, a u młodzieży i dorosłych 9–25%. Częstość nosicielstwa może być wyższa od przeciętnej w specyficznych sytuacjach, takich jak pobyt w żłobku, przedszkolu, domu opieki, więzieniu czy koszarach, gdzie częste kontakty między ludźmi przebywającymi na stosunkowo małej powierzchni sprzyjają rozprzestrzenieniu się drobnoustrojów [24, 25, 42, 60].

Istnieje wyraźna korelacja epidemiologiczna między liczbą zachorowań a częstością z jaką inwazyjne serotypy kolonizują zdrowe osoby. Z drugiej strony, choroba pneumokokowa występuje u niewielkiego odsetka skolonizowanych i zależy zarówno od tła genetycznego oraz aktualnego statusu immunologicznego gospodarza, jak również od wirulencji kolonizującego szczepu [25]. Okres kolonizacji może być bardzo różny i sięgać nawet kilku miesięcy. Średni czas trwania kolonizacji szacuje się na 31 dni u dorosłych i 60,5 dni u dzieci, a długość okresu nosicielstwa zależy od serotypu pneumokoka, wcześniejszej ekspozycji, jak również immunokompetencji gospodarza [36, 94].

Do większości zakażeń nie dochodzi podczas długotrwałego nosicielstwa pneumokoka, ale w następstwie kolonizacji nowym szczepem charakteryzującym się innym serotypem [29, 88]. Badania prowadzone podczas dwóch epidemii zapalenia płuc w koszarach wojskowych wykazały, że bezobjawowe nosicielstwo szczepu *S. pneumoniae* wiąże się z produkcją typowo swoistych przeciwciał przeciwotczkowych na poziomie pozwalającym zapobiec wywołaniu choroby przez szczep o danym serotypie. Z tych badań wynika, że aspiracja obecnych w nosogardzieli pneumokoków

w okresie pierwszych kilku tygodni kolonizacji może prowadzić do rozwoju choroby – zapalenia płuc, natomiast po tym czasie większość zdrowych nosicieli wydawała się być chroniona przed rozwojem tej choroby [55]. Powyższe sugestie potwierdzają badania innych autorów. Gray i wsp. [29] analizowali mikroflorę nosogardłową małych dzieci kilkakrotnie: co miesiąc do 6 miesiąca życia, a następnie co 2–3 miesiące do 2 roku życia. Poprzez korelację okresów kolonizacji nosogardzieli dzieci przez różne szczepy pneumokoków z chorobą pneumokokową potwierdzoną hodowlą (w 90% było to ostre zapalenie ucha środkowego) stwierdzono, że choroba związana była z pojawieniem się nowego serotypu. Mimo, że powszechny u badanych dzieci był długi czas nosicielstwa, to w 74% przypadków infekcja spowodowana była przez serotyp kolonizujący badane dziecko w czasie krótszym niż miesiąc przed wystąpieniem choroby.

Stwierdzono, że w trakcie różnych postaci choroby pneumokokowej obserwuje się zdecydowanie większą częstość nosicielstwa *S. pneumoniae* u chorych dzieci [20, 83]. Mimo, że wykrycie szczepów pneumokoka jednocześnie w nosogardzieli i miejscu fizjologicznie jałowym (ucho środkowe, płuca, krew) może oznaczać jedynie czasowy związek pomiędzy nosicielstwem a chorobą, jest jednak argumentem-potwierdzeniem, że obecność szczepu pneumokoka w nosogardzieli jest warunkiem koniecznym dla rozwoju choroby. W przypadku osób z ostrym zapaleniem ucha środkowego, od których szczep *S. pneumoniae* izolowano z wysięku z ucha środkowego, w większości przypadków (czasami nawet do 100%) szczep pneumokoka był izolowany jednocześnie z nosogardzieli chorej osoby [20, 68, 89].

Bezpośrednie powiązanie pomiędzy czasowym pojawieniem się szczepu pneumokoka w nosogardzieli a rozwojem IChP w następstwie tej obecności jest bardzo trudne do potwierdzenia, właśnie ze względu na różnice długości czasu nosicielstwa i inwazyjności różnych typów serologicznych. Serotypy wykrywane w czasie choroby pneumokokowej, które są zdolne do długiego okresu nosicielstwa, są również łatwiej izolowane w czasie badań wykrywających nosicielstwo, natomiast serotypy, krótko kolonizujące nosogardziel są rzadko izolowane w stanie nosicielstwa, jak np. serotypy 1, 5, 7, 12. Wynika to z krótkich czasowo epizodów nosicielstwa tych serotypów, bądź występowania ich w czasie wspólnej kolonizacji z innym dominującym serotypem [76].

3. Czynniki chorobotwórczości *S. pneumoniae* i ich znaczenie w patogenezie zakażeń

Pneumokok posiada liczne czynniki zjadliwości, które umożliwiają mu kolonizację błon śluzowych nosogardzieli gospodarza, jak i w sprzyjających warun-

kach wywoływanie zakażeń inwazyjnych. Wśród nich wymienia się ponad 500 powierzchniowych białek, którym przypisuje się znaczenie w patogenności, chociaż jedynie w przypadku kilku z nich rola ta została potwierdzona. Niektóre z nich są związanymi z błoną lipoproteinami, a inne są fizycznie związane ze ścianą komórkową, takie jak sześć białek wiążących penicylinę (PBP – penicillin binding protein), dwie neuraminidazy i proteaza IgA1. Wyjątkową grupą białek pneumokoków jest rodzina białek wiążących cholinę (CBP – choline binding protein). Dwanaście białek CBP, niekowalencyjnie związanych z choliną ściany komórkowej, ma charakter receptorów. Innymi białkami wchodzącymi w skład CBP są: powierzchniowe białko A (PspA – pneumococcal surface protein A), trzy autolizyny (LytA, LytB i LytC) oraz białko PspC [2, 72]. Białko PspC/CbpA (Pneumococcal surface protein C/Choline-binding protein A) jest adhezyną mającą osiem miejsc wiążących cholinę. Mutanty bakteryjne pozbawione tego białka są defektywne w kolonizacji nosogardzieli i nie potrafią wiązać się *in vitro* z różnymi komórkami człowieka. Białko PspC jest także zdolne do wiązania sekrecyjnych przeciwciał IgA1 oraz składnika C3 dopełniacza [4, 32].

Innym czynnikiem chorobotwórczości pneumokoków są składniki ściany komórkowej, w której z peptydoglikanem jest związany przez kwas N-acetylmuraminowy, polisacharyd ściany komórkowej, będący kompleksem kwasu tejchojowego zawierającego fosforylocholinę. Fosforylocholina wchodząca w skład polisacharydu ściany komórkowej jest miejscem rozpoznawanym przez autolizynę LytA, która rozkłada peptydoglikan przez hydrolizę wiązania pomiędzy alaniną i kwasem N-acetylmuraminowym, dzięki czemu bierze udział w podziale komórki, a w pewnych warunkach indukuje lizę komórek pneumokoków (np. w czasie stacjonarnej fazy wzrostu) [2]. Ściana komórkowa pneumokoków jest potencjalnym induktorem zapalenia, prawdopodobnie przez aktywację dopełniacza na drodze alternatywnej. W czasie tego procesu produkowane są anafilatoksyny C3a i C5a, które zwiększają przepuszczalność naczyń, indukują degranulację mastocytów oraz powodują gromadzenie i aktywację leukocytów wielojądrzastych oraz płytek krwi w ognisku zapalnym. Oczyszczona frakcja ściany komórkowej jest silnym stymulatorem (silniejszym od endotoksyny) produkcji interleukiny-1 (IL-1) przez ludzkie monocyty [15]. Fosforylocholina kwasu tejchojowego i lipotejchojowego jest molekularnym kluczem umożliwiającym zakażenie, ponieważ pełni rolę zarówno adhezyny (specyficznie łączy się z receptorami wiążącymi cholinę, które są obecne na praktycznie wszystkich ludzkich komórkach) jak i miejsca wiążącego w pneumokokowych białkach CBP. Cholina jest rozpoznawana przez dwa składniki gospodarza: receptor czynnika aktywującego płytki (PAFr – platelet activating factor receptor) i białko C-reaktywne [2, 18].

Najlepiej poznanym białkiem pneumokoków o charakterze toksyny jest pneumolizyna, wpływająca *in vitro* na wiele komórek gospodarza i ich funkcjonowanie. Jest ona obecna wewnątrz cytoplazmy pneumokoków i uwalniana dopiero po lizie komórki spowodowanej przez autolizynę. Przy dużym stężeniu toksyny, gromadzi się ona w postaci oligomerów i tworzy transbłonowe pory, powodując lizę komórek. Przy niższym stężeniu, pneumolizyna stymuluje produkcję cytokin zapalnych przez monocyty: czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) i interleukinę 1 (IL-1) [1, 74]. Bezpośrednich dowodów dotyczących patogenności tej toksyny dostarczyły badania z zastosowaniem wyselekcjonowanych mutantów pneumokoków pozbawionych pneumolizyny, które charakteryzowały się zmniejszoną zjadliwością w porównaniu ze szczepami macierzystymi [6]. Dodatkowo stwierdzono, że właściwości cytolityczne oraz aktywujące dopełniacz są związane z odrębnymi regionami cząsteczki tego białka [73].

Funkcjonalnie, czynniki wirulencji pneumokoków można podzielić na dwie grupy działające w różnych etapach infekcji. Jedną grupę stanowią czynniki obecne na powierzchni komórki pneumokoka (PspA, białko wiążące czynnik H), które utrudniają fagocytozę poprzez hamowanie aktywacji dopełniacza i pełnią ważną rolę na początku infekcji. Czynniki drugiej grupy (polisacharyd ściany komórkowej, pneumolizyna) pełnią swoją rolę już po lizie komórek pneumokoków, kiedy to głównie poprzez aktywację dopełniacza wzmagają stan zapalny.

Otoczka od dawna jest uznawana za główny czynnik zjadliwości pneumokoków. Zbudowana jest z polimerów, tworzonych przez jednostki powtarzających się oligosacharydów, które zawierają od jednego do ośmiu monosacharydów. Otoczka posiada działanie antyfagocytarne, tworząc barierę chroniącą przed opsonizacją komórek bakterii przez składnik C3b dopełniacza oraz przez przeciwciała [96]. Ponadto, otoczka hamuje aktywację dopełniacza klasyczną drogą w wyniku hamowania wiązania przeciwciał IgG i białka C-reaktywnego [100]. W czasie zakażenia szczepy otoczkowe są 100 tys. bardziej wirulentne od szczepów nieposiadających otoczki. Obecnie znanych jest ponad 90 typów serologicznych *S. pneumoniae*, spośród których 20 jest odpowiedzialnych za około 90% zakażeń u ludzi [2]. Częstość występowania poszczególnych serogrup/serotypów zależy od położenia geograficznego, wieku pacjenta, jak również zmienia się na przestrzeni lat. Występowanie poszczególnych serotypów wydaje się być odmienne u dzieci i u dorosłych, jak również obserwuje się różnice w ich zdolności i długości czasu kolonizacji dróg oddechowych oraz inwazyjności [14, 30, 37]. Szczepy o odmiennych serotypach różnią się

opornością na fagocytozę *in vitro* oraz zdolnością do aktywacji odpowiedzi humoralnej, stąd też pewne serotypy są częściej związane z chorobami u ludzi. Szczepy należące do serotypów 1, 2, 3, 4, 5, 8, 46 rzadko występują u nosicieli, ale są izolowane z zakażeń inwazyjnych, natomiast szczepy zaliczane do serotypów 6, 7, 9, 12F, 14, 15, 18C, 19F, 24F, powszechnie kolonizują górne drogi oddechowe, ale są również odpowiedzialne za klinicznie istotne zakażenia u dzieci i dorosłych. U dzieci najczęściej spotykane są szczepy zaliczane do serogrup 6, 14, 19, 23 zwane „pediatrycznymi”. Są one powszechnie izolowane zarówno od nosicieli oraz jako czynniki etiologiczne choroby pneumokokowej w tej grupie [25, 34, 54].

Stale prowadzone są badania nad znaczeniem otoczki w procesie kolonizacji nosogardzieli. Stwierdzono, że bezotoczkowe mutanty są mniej zdolne do kolonizacji nabłonka dróg oddechowych, jednak z drugiej strony obecność grubej otoczki jest czynnikiem zmniejszającym efektywność tego procesu. Niewiele wiadomo na temat regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę otoczki, ale przypuszcza się, że w środowisku nosogardzieli zmniejsza się poziom ekspresji tych genów, natomiast zwiększa się poziom ekspresji genów kodujących czynniki niezbędne do adhezji [47, 57].

4. Patogeneza zakażenia pneumokokowego

Komórki *S. pneumoniae* występują w trzech wyraźnie różniących się formach, tzw. *transparent*, typowa dla kolonizacji, *opaque*, występująca we krwi oraz pośrednia *semi-transparent*. Zmiana fazy, polegające na przejściu komórki typu *transparent* w *opaque* i na odwrót, ma charakter spontaniczny i jest uwarunkowana obecnością locus *opacity* w genomie. Komórki typu *transparent* charakteryzują się stosunkowo cienką otoczką, wysoką zawartością ufosforylowanej cholicy w ścianie komórkowej, co stwarza możliwości zaktivizowania licznych białek powierzchniowych, a także obecnością autolizyny LytA i adhezyny PspC w ścianie komórkowej, ułatwiających kolonizację nosogardzieli. Białek tych jest znacznie mniej u charakterystycznych dla bakterii form *opaque* [19]. Szczepy o fenotypie *transparent*, posiadające silniejsze zdolności adhezyjne, wywołują zlokalizowane infekcje, podczas gdy te o mniejszych zdolnościach adhezji (fenotyp *opaque*) powodują inwazyjne choroby, jak bakteriemia i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych [98].

Wrotami zakażenia *S. pneumoniae* są górne drogi oddechowe. We wczesnej fazie kolonizacji komórki pneumokoka unikają usunięcia z powierzchni błon śluzowych, dzięki ujemnemu naładowaniu struktury otoczki, prawdopodobnie na drodze oddziaływań fizy-

kochemicznych [36]. Ujemnie naładowana otoczka uniemożliwia jednak skuteczną adhezję bakterii do komórek nabłonka gospodarza, dlatego w kolejnym etapie, komórka pneumokoka w celu neutralizacji jest w stanie wiązać z otoczenia dodatkowo naładowane molekuly, co prowadzi do ułatwienia procesu adhezji [28, 97]. W pierwszym etapie kolonizacji błony śluzowej nosogardzieli bakterie ulegają adhezji do komórek nabłonkowych z udziałem licznych czynników, do których należą: białko PspC, główna adhezyna niezbędna do skutecznej kolonizacji [4], pneumolizyna, białko uwalniane po autolizie pneumokoków, inicjująca prawdopodobnie procesy zapalne w nosogardzieli, niezbędne do ekspresji receptorów komórkowych [39, 74] oraz dwie neuraminidazy NanA i NanB, pełniące pomocniczą rolę w adhezji [90]. Neuraminidazy mogą ułatwiać wiązanie *S. pneumoniae* do komórek nabłonka, dzięki rozkładaniu kwasu sialowego, wchodzącego w skład glikolipidów i gangliozydów komórek nabłonkowych gospodarza, powodując odsłonięcie struktur wykorzystywanych jako receptory w procesie adhezji (N-acetyloglukozamina, NAcGlc), do których bakterie wiążą się poprzez białka powierzchniowe ściany komórkowej, takie jak PsaA (pneumococcal surface adhesin A) [41].

Kolonizacji nosogardzieli towarzyszy najczęściej zaburzenie pracy rzęsek wysięlających drogi oddechowe, które jest wynikiem destrukcyjnego działania pneumolizyny i wydzielanego przez pneumokoki nadciśnienia wodoru, wytwarzanego przez oksydazę pirogromianową. Enzym ten został zidentyfikowany jako jeden z czynników odgrywających istotną rolę w kolonizacji nosogardzieli przez *S. pneumoniae* [74, 84]. Pneumokoki wytwarzają również kilka egzoenzymów, które modyfikują powierzchnię komórek gospodarza poprzez deglikozylację, eksponując w ten sposób nowe receptory do adhezji, hamując mechanizmy usuwania bakterii z błon śluzowych i dostarczając substancji odżywczych bakteriom [40, 50]. Niektóre izolaty pneumokoków są zdolne do wytwarzania struktur podobnych do fimbrii, które wystają poza wielocukrową otoczkę i biorą udział w adhezji do nabłonka dróg oddechowych [5].

Za najważniejsze działanie bezpośrednie na układ immunologiczny gospodarza należy uznać wydzielanie do środowiska proteazy, hydrolizującej przeciwciała klasy IgA1 oraz obniżenie poziomu składnika C3 dopełniacza, w czym prawdopodobnie odgrywa rolę pneumolizyna [1, 97]. Również ważną rolę odgrywa białko powierzchniowe PspA, które przeciwdziała wiązaniu składnika C3 dopełniacza i tym samym zapobiega lizie bakterii, pełniąc funkcję ochronną przed działaniem nieswoistych mechanizmów układu immunologicznego człowieka [70, 93]. Wykryte u pneumokoków białko PavA (pneumococcal adherence and virulence factor) wiążące fibronektynę również wydaje

się pełnić istotną, modulującą rolę zarówno w procesie adhezji, jak i w rozwoju inwazyjnych postaci choroby pneumokokowej [67].

Przekroczenie granicy pomiędzy bezobjawową kolonizacją a inwazyjną chorobą związany jest z pojawieniem się czynników pro-zapalnych takich, jak IL-1 czy TNF- α , co ma miejsce na przykład w przebiegu infekcji wirusowej. Rozwój kaskadowej reakcji procesu zapalnego zmienia liczbę i typ receptorów na powierzchni komórek nabłonkowych i śródbłónka. W obrębie pęcherzyków płucnych pneumokoki przylegają początkowo do ściany pęcherzyka, a dzięki właściwości przenikania w poprzek śródbłónka naczyń na drodze transcytozy, szybko przedostają się do krwi. Jeżeli w przebiegu infekcji pojawia się bakteriemia rośnie ryzyko wystąpienia zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Drogą krwi komórki bakterii mogą migrować do opon mózgowo-rdzeniowych, a po uszkodzeniu śródbłónka dotrzeć do przestrzeni podpajęczynówkowej. Alternatywną drogą dotarcia bakterii do opon mózgowo-rdzeniowych jest bezpośrednio transmisja z nosogardzieli [2, 60].

Przy nieobecności stanu zapalnego, adhezja do komórek nabłonkowych w płucach odbywa się przy udziale receptorów gospodarza posiadających specyficzne dwucukry (N-acetyloglukozamino- β 1-4-galaktoza, N-acetylogalaktozamino- β -1-3-galaktozamina), które są podobne do receptorów występujących na powierzchni komórek nabłonkowych nosogardzieli oraz adhezyn pneumokoków – fosforylocholiny ściany komórkowej i białek adhezyjnych (np. PsaA) [87]. Pneumokoki posiadają również zdolność adhezji i inwazji komórek nabłonkowych płuc i śródbłónka w czasie stanu zapalnego, gdy obserwuje zwiększoną ekspresję receptora PAF na powierzchni. Kiedy komórka bakterii połączy się za pomocą bakteryjnej fosforylocholiny (ChoP) z receptorem PAF, jest w stanie pokonać bariery biologiczne na drodze transcytozy, w tym barierę krew-mózg [71]. Pneumokoki wykorzystują naturalny mechanizm gospodarza adhezji i migracji przez warstwę nabłonkową i śródbłónka wydzielniczych IgA poprzez wiązanie się białka PspC bezpośrednio z receptorem polimerycznych przeciwciał (pIgR – polymeric-immunoglobulin receptor) [4]. Taką zdolność zaobserwowano u wirulentnych komórek o fenotypie *transparent*, podczas gdy komórki *opaque* bardzo słabo wiązały się i wnikały do wnętrza śródbłónka. Jak wykazały badania *in vitro*, adhezja pneumokoków i przejście przez barierę śródbłónka trwa około 4 godzin [18]. W jaki sposób komórki pneumokoków unikają zabicia w czasie endocytozy nie zostało jeszcze wyjaśnione.

W tym etapie infekcji aktywacja składników dopełniacza wzmacnia stan zapalny i wydaje się być punktem, w którym zakażenie rozwija się w sposób trudny do

zahamowania. Niekontrolowane namnażanie pneumokoków w płucach, płynie mózgowo-rdzeniowym czy uchu środkowym jest związane z lizą ich komórek i uwolnieniem składników ściany komórkowej oraz pneumolizyny. Obecność lizozymu w płynach ustrojowych w miejscu infekcji może powodować lizę komórek tych bakterii poprzez aktywację autolizyn. Rozpad komórek pneumokoków jest momentem zapoczątkowania procesu zapalnego, bezpośrednio przez gromadzenie i aktywację fagocytów, jak również pośrednio przez aktywację dopełniacza. Prawdopodobnie niekontrolowany rozwój stanu zapalnego jest odpowiedzialny za chorobotwórczość i śmiertelność w wyniku infekcji pneumokokowej, a eliminacja komórek bakterii z miejsca infekcji dzięki terapii antybiotykowej nie poprawia stanu chorego i nie zmienia przebiegu choroby. Ponadto, indukcja lizy komórek pneumokoków za pomocą skutecznych, bakteriobójczych antybiotyków, jak β -laktamy (zwłaszcza, gdy są podawane w późnym stadium infekcji) może nawet nasilić objawy kliniczne choroby [2].

5. Odporność przeciwpneumokokowa gospodarza

Naturalna odporność na zakażenie *S. pneumoniae* rozwija się podczas ekspozycji na drobnoustroj lub jego antygeny. W zakażonym organizmie powstają swoiste przeciwciała antyotoczkowe, głównie izotypu IgG2, które odgrywają istotną rolę jako opsoniny w procesie fagocytozy z udziałem leukocytów wielojądrzastych oraz makrofagów pęcherzyków płucnych. Opsonizacja pneumokoków jest bardzo ważnym etapem, co potwierdza fakt, że zarówno nieefektywność fagocytozy (asplenia, neutropenia), jak i zaburzeń w produkcji przeciwciał (np. hipogammaglobulinemia, niezdolność do produkcji przeciwciał przeciwko antygenom polisacharydowym u dzieci, brak IgA) czy niespecyficznych opsonin (brak składników dopełniacza) są czynnikami predysponującymi do zakażeń pneumokokowych [61].

Od dawna uważa się, że pojawienie się odporności na zakażenie pneumokokowe jest związane przede wszystkim z obecnością przeciwciał antyotoczkowych. Jednak spadek nosicielstwa i zachorowalności związany z wiekiem, dotyczy większości serotypów i jest obserwowany również przy nieobecności powstałych w naturalny sposób przeciwciał antyotoczkowych. Sugeruje to istnienie uniwersalnego (powszechnego) mechanizmu ochrony przeciwpneumokokowej, prawdopodobnie niezależnego od serotypu pneumokoka. Wykazano, że donosowe podawanie myszom szczepionki zawierającej całe komórki bezotoczkowych pneumokoków zapobiega kolonizacji przez szczepy o różnych serotypach, co pozwala przypuszczać, że inne składniki układu

immunologicznego, poza przeciwciałami antyotoczkowymi, pełnią ważną rolę w tym procesie [13, 48, 56].

Ostatnio prowadzone badania na modelach zwierzęcych i u bezobjawowych nosicieli sugerują, że humoralna odpowiedź na pneumokokowe czynniki wirulencji, takie jak polisacharyd ściany komórkowej (głównie fosforylocholina), PsaA, PspA, PspC czy pneumolizynę może mieć również znaczenie w odporności przeciw pneumokokowej [62, 101]. W przypadku przetoczenia myszom ludzkich przeciwciał IgG przeciwko fosforylocholiny polisacharydu ściany komórkowej pneumokoka, obserwowano ochronę zwierząt przed inwazyjną infekcją [27]. Najbardziej prawdopodobny mechanizm ochronnego działania tych przeciwciał u myszy nie jest związany z fagocytozą, ale z neutralizacją prozapalnego działania fosforylocholiny jako ligandu dla białka C-reaktywnego [2]. Badania prowadzone w Finlandii [69] i Kenii [44] wykazały, że u dzieci do drugiego roku życia w trakcie nosicielstwa *S. pneumoniae* wzrasta poziom przeciwciał skierowanych przeciwko białkom pneumokoka. Podczas badań nad nosicielstwem pneumokoków u ludzi stwierdzono, że wrażliwość na kolonizację nie jest związana z poziomem przeciwciał antyotoczkowych w surowicy, natomiast u wszystkich skolonizowanych eksperymentalnie ochotników wykryto przeciwciała IgG w surowicy i sekrecyjne IgA skierowane przeciwko NH₂-końcowemu regionowi białka PspA [51]. Okazało się również, że immunizacja donosowa myszy antygenem PsaA prowadzi do wytworzenia wysokiego poziomu ochrony przed nosicielstwem pneumokoków [12]. Mimo, że przeciwciała specyficzne dla polisacharydu ściany komórkowej, PspA czy pneumolizyny posiadają zdolność ochrony przed zakażeniem w mniejszym stopniu, wydaje się, że odpowiedź na kilka tych białek jednocześnie może zapewnić szeroką protekcję przed nosicielstwem w sposób niezależny od serotypu. Jednak ostatnie badania wykazały, że protekcja przeciwko kolonizacji pneumokokami jest zależna od limfocytów T CD4 i prawdopodobnie występuje niezależnie od pojawienia się przeciwciał [49]. Badania nosicielstwa *S. pneumoniae* u myszy, porównujące to zjawisko u myszy z defektem tworzenia przeciwciał i myszy z defektem limfocytów T, sugerują, że uczulone limfocyty T CD4 są kluczowe dla zjawiska usuwania pneumokoków ze śluzówek, natomiast przeciwciała skierowane przeciwko antygenom pneumokokowym mają wpływ, ale nie są wymagane dla ochrony przed kolonizacją [92].

Naturalna ekspozycja na pneumokoki indukuje powstanie u dzieci przeciwciał wydzielniczych klasy IgA, skierowanych przeciwko pneumokokowym białkom oraz wielocukrowi otoczkowemu [77, 78]. Mimo, że ochronna rola tych przeciwciał nie jest jeszcze jasna, badania na immunizowanych myszach potwierdzają ich ważną ochronną rolę przed kolonizacją nosogardzieli przez pneumokoki [11, 23].

6. Profilaktyka zakażeń pneumokokowych

W chwili obecnej dostępne są dwa rodzaje szczepionek przeciwko zakażeniom *S. pneumoniae*; w przypadku obu typów działanie protekcyjne opiera się na tworzeniu przeciwciał przeciwko antygenom wielocukrowej otoczki. Powstałe po immunizacji przeciwciała są zdolne do opsonizacji szczepów posiadających serotyp włączony do szczepionki.

Pierwsza generacja szczepionek to polisacharydowe 23-walentne szczepionki zawierające wielocukry otoczkowe pochodzące z 23 serotypów (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F). Skuteczność tych szczepionek zależy od wielu czynników i wynosi średnio u dorosłych 60–70%. Wytwarzanie swoistych przeciwciał przeciwko antygenom (co najmniej dwukrotny wzrost poziomu przeciwciał swoistych antygenowo) rozpoczyna się u 80% zdrowych dorosłych w ciągu 2–3 tygodni po szczepieniu. Szczepionka ta wykazuje dużą skuteczność w zapobieganiu inwazyjnym zakażeniom: pneumokokowemu zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych i bakteriemii u osób z prawidłową odpornością (57–85% skuteczności), u osób z współistniejącymi chorobami (65–84% skuteczności). Mniejszą skuteczność tej szczepionki stwierdzono w zapobieganiu nieinwazyjnemu zapaleniu płuc, a brak działania ochronnego przeciw infekcjom górnych dróg oddechowych [15, 17]. Ponadto, badania prowadzone w Wielkiej Brytanii, wskazują, że użycie tych szczepionek u osób starszych jest dyskusyjne ze względu na brak dowodów jej skuteczności w zmniejszeniu występowania IChP, mimo ich szerokiego stosowania od 2003 roku [91].

Szczepionka polisacharydowa, ze względu na zawartość antygenów wielocukrowych, które jako antygeny T-niezależne nie indukują u dzieci trwałej odporności poszczepiennej i pamięci immunologicznej, nie jest skuteczna u dzieci poniżej 2. roku życia, jak również cechuje się słabszą immunogennością u dzieci poniżej 7–8. roku życia. Wyjątek stanowią antygeny wielocukrowe serotypów 3 i 8, które nawet u małych dzieci są skutecznymi immunogenami [3, 17].

W grupie dzieci poniżej 2. roku życia, wykazano wysoką skuteczność szczepionek drugiej generacji, koniugowanych z białkami nośnikowymi o wysokiej immunogenności, jak np. anatoksyna błonicza, anatoksyna tężcowa, oczyszczona nietoksyczna odmiana toksyny maczugowca błonicy, meningokokowy kompleks białkowy błony zewnętrznej (OMPC – outer membrane protein complex). Jest to związane przede wszystkim z pobudzaniem odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego, zależnej od limfocytów T, które po kontakcie z kompleksami polisacharydowo-białkowymi uzyskują zdolność indukowania wzmożonej proliferacji antygenowo swoistych limfocytów B

oraz dojrzewania komórek pamięci immunologicznej. Uważa się, że po szczepieniu szczepionką koniugowaną uzyskuje się wyższe miano przeciwciał antyotoczkowych klasy IgA oraz IgG w surowicy [63]. Podskórna immunizacja myszy wykazała, że najskuteczniejszą ochroną przed kolonizacją pneumokokami było indukowanie przeciwciał izotypu IgG2a, charakteryzujących się zdolnością aktywacji dopełniacza [22]. Przyпуска się, że możliwym mechanizmem chroniącym dzieci przed kolonizacją *S. pneumoniae* uzyskiwanym po immunizacji domięśniowej koniugowanymi szczepionkami jest właśnie indukcja przeciwciał aktywujących dopełniacz [11].

Pierwsza koniugowana szczepionka 7-walentna (PCV7) została zarejestrowana w 2000 roku (w Polsce w 2001) i zawierała wielocukry otoczkowe szczepów najczęściej izolowanych z krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego u dzieci poniżej 6 roku życia w Stanach Zjednoczonych (4, 6B, 14, 19F, 18C, 23F, 9V) [33]. Badania przeprowadzone w Polsce wykazały, że serotypy szczepionkowe PCV7 reprezentują 80–85% szczepów izolowanych z nosogardzieli u zdrowych dzieci do 5. roku życia, a także od chorych z inwazyjnymi postaciami zakażeń [43, 58, 82, 85, 86].

Ocena efektów szczepień PCV7 na świecie wykazała blisko 98% skuteczność w zapobieganiu IChP wywołanej przez serotypy szczepionkowe u dzieci do 5 roku życia oraz zmniejszenie o 55% zapadalność na IChP wśród osób po 65. roku życia [7, 8, 95, 99]. Nie planowanym pierwotnie efektem szczepień, okazała się redukcja przypadków zapalenia płuc od 18% do 25% [9, 46, 102]. Ponadto, u dzieci szczepionych zanotowano blisko 60% redukcję przypadków zapalenia uszu wywołanych przez serotypy szczepionkowe, a 7% redukcję wywołanych przez szczepy nieszczepionkowe [65]. Badania nad skutecznością PCV7 przeprowadzone w Finlandii wskazały na zmniejszenie wszystkich epizodów ostrego zapalenia ucha środkowego o 7%, w tym zmniejszenie tych chorób o etiologii pneumokokowej o 34% oraz 57% skuteczność w zmniejszeniu liczby przypadków wywołanych przez serotypy zawarte w szczepionce [21]. Zmniejszenie skuteczności szczepienia w stosunku do zapalenia ucha środkowego i zapalenia płuc może wskazywać, że na ochronę przeciwko chorobom związanym z błonami śluzowymi układu oddechowego mogą wpływać jeszcze inne mechanizmy poza obecnością przeciwciał przeciwotoczkowych. Obserwowano również znaczne obniżenie liczby wizyt dzieci < 2. roku życia związanych z ostrym zapaleniem ucha środkowego (do 42,7%) oraz redukcję zalecanych kuracji antybiotykowych o około 41,7% [31]. Stwierdzono, że szczepienie małych dzieci wywiera także efekt pośredni, wywołując tzw. odporność grupową (populacyjną), łącznie u dzieci i u dorosłych. Szczepionka koniugowana, zapobiegając naby-

waniu nosicielstwa przez dziecko, zmniejsza częstość występowania zakażeń inwazyjnych zarówno u dzieci nieszczepionych, jak i u dorosłych, głównie w dwóch grupach wiekowych: 20–40 lat (rodziców) i powyżej 60 lat (dziadków). Wynikiem odporności populacyjnej było także uzyskanie 40% spadku inwazyjnych zakażeń u noworodków i niemowląt do 90. dnia życia [16, 66]. Centers of Diseases Control and Prevention (CDC) oszacowało, że skuteczność szczepionki koniugowanej w Stanach Zjednoczonych w 2/3 przypadków może być przypisana właśnie odporności populacyjnej [53].

Jednak, stosowanie PCV-7 na szeroką skalę spowodowało wzrost występowania choroby pneumokokowej wywołanej przez serotypy nieszczepionkowe, np. w Stanach Zjednoczonych stwierdzono, że serotypy 3, 7F i 19A zaczęły dominować jako czynniki etiologiczne IChP u dzieci poniżej 5. roku życia [35, 75, 79]. Prawdopodobnie z powodu wymiany serotypów wywołujących infekcje nie obserwowano znaczącej zmiany w częstości IChP w Wielkiej Brytanii [26], czy częstości zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych we Francji [45].

Aby zwiększyć skuteczność szczepień i ominąć zjawisko wymiany serotypów, pojawiły się nowe koniugowane szczepionki zawierające w swym składzie większą liczbę serotypów. W 2009 roku zarejestrowano koniugowaną szczepionkę 10-walentną, zawierającą dodatkowo polisacharydy pochodzące serotypów 1, 5, i 7F pneumokoków, z których 8 jest sprzężonych z białkiem D pochodzącym z bezotoczkowych szczepów *Haemophilus influenzae*. Najnowsza szczepionka 13-walentna, wprowadzona w lutym 2010 roku, chroni przed zakażeniami serotypami 3, 6A i 19A zwiększając pulę serotypów 10-walentnej szczepionki, a tym samym obejmując ponad 80% inwazyjnych serotypów pneumokoka w większości regionów świata [38]. W następnych latach spodziewana jest rejestracja nowej 15-walentnej szczepionki koniugowanej [80]. Projektowanie nowych szczepionek zawierających coraz to większą liczbę wielocukrowych koniugatów jest bardzo drogie w produkcji, co wpływa na wysoką cenę szczepionek, a tym samym ogranicza możliwość ich stosowania w wielu krajach. Nowe badania prowadzone na modelach zwierzęcych oraz dotyczące nosicielstwa u ludzi wskazują, że w ochronie przeciwko kolonizacji i wystąpieniu choroby pneumokokowej biorą udział nie tylko przeciwciała skierowane przeciwko wielocukrowej otoczce pneumokoka, ale również te powstałe przeciwko antygenom białkowym tego drobnoustroju. W związku z tym przeprowadza się badania nad możliwością włączenia jako składników szczepionki przeciwko *S. pneumoniae* białek tego drobnoustroju, takich jak powierzchniowe białko PspA, adhezyna PsaA lub pneumolizyna, czego następstwem byłoby uzyskanie odporności na ponad 90 serotypów tego drobnoustroju [10].

7. Podsumowanie

Rozwój choroby pneumokokowej jest wynikiem wielokierunkowych i złożonych interakcji patogen-organizm gospodarza. Pneumokok posiada wiele czynników wirulencji, które mają znaczenie zarówno dla kolonizacji nabłonka dróg oddechowych jak i inwazyjności danego szczepu. Warunkiem koniecznym do rozwoju choroby jest kolonizacja nosogardzieli przez *S. pneumoniae* i w większości przypadków jest to kolonizacja nowym serotypem.

Szerokie stosowanie szczepionek koniugowanych w niektórych krajach realnie zmniejszyło liczbę przypadków IChP powodowanej przez serotypy szczepionkowe, ale zaobserwowano wzrost liczby przypadków wywoływanych przez serotypy nieszczepionkowe. Można przypuszczać, że szczepionka przyszłości będzie zawierała jako antygeny pneumokokowe rekombinowane białka, które będą wykazywały wysoką immunogenność i będą uniwersalne dla wszystkich szczepów *S. pneumoniae*.

Piśmiennictwo

- Alcantara R.B., Preheim L.C., Gentry-Nielsen M.J.: Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect. Immun.* **69**, 3569–3575 (2001)
- AlonsoDeVelasco E., Verheul A.F.M., Verhoef J., Snippe H.: *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis and vaccines. *Microbiol. Rev.* **59**, 591–603 (1995)
- American Academy of Pediatrics, Committee of Infectious Diseases: Policy statement: Recommendations for prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Prevnar), pneumococcal polysaccharide vaccine, and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*, **106**, 362–366 (2000)
- Balachandran P., Brooks-Walter A., Virolainen-Julkunen A., Hollingshead S.K., Briles D.E.: Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **70**, 2526–2534 (2002)
- Barocchi M.A., Henriques-Normark B. i wsp.: A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2857–2862 (2006)
- Berry A.M., Alexander J.E., Mitchell T.J., Andrew P.W., Hansman D., Paton J.C.: Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**, 1969–1974 (1995)
- Black S., Shinefield H., Baxter R., Austrian R., Bracken L., Hansen J., Lewis E., Fireman B.: Postlicensure surveillance for pneumococcal invasive disease after use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in Northern California Kaiser Permanente. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**, 485–489 (2004)
- Black S., Edwards K. i wsp.: Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **19**, 187–195 (2000)
- Black S.B., Hackell J. i wsp.: Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than five years of age for prevention of pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**, 810–815 (2002)
- Briles D.E., Hollingshead S., Brooks-Walter A., Nabors G.S., Ferguson L., Schilling M., Gravenstein P., King J., Swift A.: The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine*, **18**, 1707–1711 (2000)
- Briles D.E., Miyaji E., Fukuyama Y., Ferreira D.M., Fujihashi K.: Elicitation of mucosal immunity by proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Adv. Otorhinolaryngol.* **72**, 25–27 (2011)
- Briles D.E., McDaniel L.S. i wsp.: Pneumococcal diversity: consideration for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 645–657 (1998)
- Brooks-Walter A., Briles D.E., Hollingshead S.K.: The pspC gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect. Immun.* **67**, 6533–6542 (1999)
- Brueggemann A.B., Peto T.E., Crook D.W., Butler J.C., Kristinson K.G., Spratt B.G.: Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J. Infect. Dis.* **190**, 1203–1211 (2004)
- Bruyn G.A., van Furth R.: Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 897–910 (1991)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease – United States, 1998–2003. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* **54**, 893–897 (2005)
- Centers for Disease Control: Prevention of pneumococcal disease recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly Rep.* **46**, 1–24 (1997)
- Cundell D.R., Gerard N.P., Gerard C., Idanpaan-Heikkilä I., Tuomanen E.I.: *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, **377**, 435–438 (1995)
- Cundell D.R., Weiser J.N., Shen J., Young A., Tuomanen E.I.: Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**, 757–761 (1995)
- Eldan M., Leibovitz E., Piglansky L., Raiz S., Press J., Yagupsky P., Leiberman A., Dagan R.: Predictive value of pneumococcal nasopharyngeal cultures for the assessment of nonresponsive acute otitis media in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **19**, 298–303 (2000)
- Eskola J., Mäkelä P.H. i wsp.: Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N. Engl. J. Med.* **344**, 403–409 (2001)
- Ferreira D.M., Oliveira M.L., Moreno A.T., Ho P.L., Briles D.E., Miyaji E.N.: Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). *Microb Pathog.* **48**, 205–213 (2010)
- Fukuyama Y., King J.D., Kataoka K., Kobayashi R., Gilbert R.S., Oishi K., Hollingshead S.K., Briles D.E., Fujihashi K.: Secretory-IgA antibodies play an important role in the immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.* **185**, 1755–1762 (2010)
- Garcia-Rodriguez J.A., Martinez M.J.F.: Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **50** (Suppl. S2), S59–73 (2002)
- Ghaffar F., Friedland I.R., McCracken G.H.: Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**, 638–646 (1999)
- Gladstone R.A., Jefferies J.M., Faust S.N., Clarke S.C.: Continued control of pneumococcal disease in the UK – the impact of vaccination. *J. Med. Microbiol.* **60**, 1–8 (2011)

27. Goldenberg H.B., McCool T.L., Weiser J.N.: Cross-reactivity of human immunoglobulin G2 recognizing phosphorylcholine and evidence for protection against major bacterial pathogens of the human respiratory tract. *J. Infect. Dis.* **190**, 1254–1263 (2004)
28. Gorter A.D., Hiemstra P.S., de Bentzmann S., van Wetering S., Dankert J., van Alphen L.: Stimulation of bacterial adherence by neutrophil defensins varies among bacterial species but not among host cell types. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **28**, 105–111 (2000)
29. Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C.: Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.* **142**, 923–933 (1980)
30. Greenberg D., Givon-Lavi N., Newman N., Bar-Ziv J., Dagan R.: Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric pneumonia as a means to estimate serotype disease potential. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**, 227–233 (2011)
31. Grijalva C.G., Poehling K.A., Nuorti J.P., Zhu Y., Martin S.W., Edwards K.M., Griffin M.R.: National impact of universal childhood immunization with pneumococcal conjugate vaccine on outpatient medical care visits in the United States. *Pediatrics*, **118**, 865–73 (2006)
32. Hammerschmidt S., Talay S.R., Brandtzaeg P., Chhatwal G.S.: SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol. Microbiol.* **25**, 1113–1124 (1997).
33. Hausdorff W.P., Bryant J., Paradiso P.R., Siber G.R.: Which pneumococcal serogroups cause the most invasive diseases: implications for conjugate vaccine formulation and use, Part I. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 100–121 (2000)
34. Hausdorff W.P., Feikin D.R., Klugman K.P.: Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 83–93 (2005)
35. Hicks L.A., Whitney C.G. i wsp.: Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. *J. Infect. Dis.* **196**, 1346–1354 (2007)
36. Hill P.C., Townend J., Antonio M., Akisanya B., Ebruke C., Lahai G., Greenwood B.M., Adegbola R.A.: Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in rural Gambian villages: a longitudinal study. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 1468–1476 (2010)
37. Högborg L., Geli P., Ringberg H., Melander E., Lipsitch M., Ekdahl K.: Age- and serogroup-related differences in observed durations of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant pneumococci. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 948–952 (2007)
38. Isaacman D.J., McIntosh E.D., Reinert R.R.: Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e197–209 (2010)
39. Kadioglu A., Taylor S., Iannelli F., Pozzi G., Mitchell T.J., Andrew P.W.: Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect. Immun.* **70**, 2886–2890 (2002)
40. King S.J.: Pneumococcal modification of host sugars: a major contributor to colonization of the human airway? *Mol. Oral Microbiol.* **25**, 15–24 (2010)
41. King S.J., Hippe K.R., Gould J.M., Bae D., Peterson S., Cline R.T., Fasching C., Janoff E.N., Weiser J.N.: Phase variable desialylation of host proteins that bind to *Streptococcus pneumoniae* in vivo and protect the airway. *Mol. Microbiol.* **54**, 159–171 (2004)
42. Korona-Główniak I., Niedzielski A., Malm A.: Upper respiratory colonization by *Streptococcus pneumoniae* in healthy preschool children in south-east Poland. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **75**, 1529–1534 (2011)
43. Korona-Główniak I., Niedzielski A., Malm A., Niedzielska G. Serotypes and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* from adenoids in preschool children with recurrent upper respiratory tract infections. *Pol. J. Microbiol.* **62**, 385–390 (2013)
44. Laine C., Mwangi T., Thompson C.M., Obiero J., Lipsitch M., Scott J.A.: Age-specific immunoglobulin G (IgG) and IgA to pneumococcal protein antigens in a population in coastal Kenya. *Infect. Immun.* **72**, 3331–3335 (2004)
45. Levy C., Varon E., Bingen E., Lécuyer A., Boucherat M., Cohen R.; Bacterial Meningitis Study Group. Pneumococcal meningitis in French children before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**, 168–70 (2011)
46. Madhi S.A., Levine O.S., Hajjeh R., Mansoor O.D., Cherian T.: Vaccines to prevent pneumonia and improve child survival. *Bull. World Health Organ.* **86**, 365–372 (2008)
47. Magee A.D., Yother J.: Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **69**, 3755–3761 (2001)
48. Malley R., Lipsitch M., Stack A., Saladino R., Fleisher G., Pelton S., Thompson C., Briles D., Anderson P.: Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. *Infect. Immun.* **69**, 4870–4873 (2001)
49. Malley R., Trzcinski K., Srivastava A., Thompson C.M., Anderson P.W., Lipsitch M.: CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4848–4853 (2005)
50. Marion C., Limoli D.H., Bobulsky G.S., Abraham J.L., Burnaugh A.M., King S.J.: Identification of a pneumococcal glycosidase that modifies O-linked glycans. *Infect. Immun.* **77**, 1389–1396 (2009)
51. McCool T.L., Cate T.R., Moy G., Weiser J.N.: The immune response to pneumococcal proteins during experimental human carriage. *J. Exp. Med.* **195**, 359–365 (2002)
52. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce. http://www.pzh.gov.pl/epimeld/index_p.html (1.03.2013).
53. Moffitt K.L., Gierahn T.M., Lu Y.J., Gouveia P., Alderson M., Flechtner J.B., Higgins D.E., Malley R.: T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell Host Microbe*, **9**, 158–165 (2011)
54. Müller-Graf C.D.M., Whatmore A.M., King S.J., Trzciński K., Pickerill A.P., Doherty N., Paul J., Griffiths D., Crook D., Dowson C.G.: Population biology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from oropharyngeal carriage and invasive disease. *Microbiology* **145**, 3283–3293 (1999)
55. Musher D.M., Groover J.E., Reichler M.R., Riedo F.X., Schwartz B., Watson D.A., Baughn R.E., Breiman R.F.: Emergence of antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* during outbreaks of pneumonia: association with nasopharyngeal colonization. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 441–446 (1997)
56. Nabors G.S., Becker R.S. i wsp.: Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies. *Vaccine* **23**, 4257–4262 (2005)
57. Nelson A.L., Roche A.M., Gould J.M., Chim K., Ratner A.J., Weiser J.N.: Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.* **75**, 83–90 (2007)

58. Niedzielski A., Korona-Główniak I., Malm A., Mielnik-Niedzielska G.: Distribution of vaccine serotypes among *Streptococcus pneumoniae* colonizing the upper respiratory tract in healthy pre-school children in south-east Poland. *Otolaryngol. Pol.* **66**, 403–406 (2012)
59. O'Brien K.L., Cherian T. i wsp.: Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, **374**, 893–902 (2009)
60. Obaro S., Adegbola R.: The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *J. Med. Microbiol.* **51**, 98–104 (2002)
61. Obaro S.K., Monteil M.A., Henderson D.C.: Pneumococcal problem. *Br. Med. J.* **312**, 1521–1525 (1996)
62. Palaniappan R., Singh S., Singh U.P., Sakthivel K.S.K., Ades E.W., Briles D.E., Hollingshead S.K., Paton J.C., Sampson J.S., Lillard Jr J.W.: Differential PsaA-, PspA-, PspC-, and PdB-specific immune responses in a mouse model of pneumococcal carriage. *Infect. Immun.* **73**, 1006–1013 (2005)
63. Peters T.R., Edwards K.M.: Pneumococcal vaccines: present and future. *Pediatr. Ann.* **31**, 261–268 (2002)
64. Pneumococcal Disease – Centers for Disease Control and Prevention www.cdc.gov/vaccines/pubs/.../pneumo.pdf
65. Poehling K.A., Szilagyi P.G., Grijalva C.G., Martin S.W., LaFleur B., Mitchel E., Barth R.D., Nuorti J.P., Griffin M.R.: Reduction of frequent otitis media and pressure-equalizing tube insertions in children after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*, **119**, 707–715 (2007)
66. Poehling K.A., Schaffner W. i wsp.: Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA*, **295**, 1668–1674 (2006)
67. Pracht D., Elm C., Gerber J., Bergmann S., Rohde M., Seiler M., Kim K.S., Jenkinson H.F., Nau R., Hammerschmidt S.: PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion and meningitis inflammation. *Infect. Immun.* **73**, 2680–2689 (2005)
68. Radzikowski A., Skórka A., Mikołajczyk W., Woźniak M., Wysocki J.: Does nasopharyngeal bacterial flora predict etiology of acute otitis media in children? *Pediatr. Pol.* **86**, 620–623 (2011)
69. Rapola S., Käyhty H. i wsp.: Natural development of antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A, and pneumolysin in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. *J. Infect. Dis.* **182**, 1146–1152 (2000)
70. Ren B., Szalai A.J., Hollinshead K., Briles D.E.: Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect. Immun.* **72**, 114–122 (2004)
71. Ring A., Weiser J.N., Tuomanen E.I.: Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier: molecular model of a novel bidirectional pathway. *J. Clin. Invest.* **102**, 347–360 (1998)
72. Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortqvist A., Masure H.R.: Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**, 819–829 (1997)
73. Rossjohn J., Gilbert R.J.C., Crane D., Morgan P.J., Mitchell T.J., Rowe A.J., Andrew P.W., Paton J.C., Tweten R.K., Parker M.W.: The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **284**, 449–461 (1998)
74. Rubins J.B., Janoff E.N.: Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J. Lab. Clin. Med.* **131**, 21–27 (1998)
75. Salleras L., Domínguez A., Ciruela P., Izquierdo C., Navas E., Torner N., Borrás E.: Changes in serotypes causing invasive pneumococcal disease (2005–2007 vs. 1997–1999) in children under 2 years of age in a population with intermediate coverage of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 997–1001 (2009)
76. Simell B., Auranen K., Kayhty H., Goldblatt D., Dagan R., O'Brien K.L.; for the Pneumococcal Carriage Group (Pneumo-Carr). The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev. Vaccines*, **11**, 841–855 (2012)
77. Simell B., Kilpi T.M., Käyhty H.: Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides in children. *J. Infect. Dis.* **186**, 1106–1114 (2002)
78. Simell B., Korkeila M., Pursiainen H., Kilpi T.M., Käyhty H.: Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal surface adhesin A, pneumolysin, and pneumococcal surface protein A in children. *J. Infect. Dis.* **183**, 887–896 (2001)
79. Singleton R.J., Hennessy T.W., Bulkow L.R., Hammit L.L., Zulz T., Hurlburt D.A., Butler J.C., Rudolph K., Parkinson A.: Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA*, **297**, 1784–1792 (2007)
80. Skinner J.M., Heinrichs J.H. i wsp.: Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. *Vaccine*, **29**, 8870–8876 (2011)
81. Skoczyńska A., Kuch A., Gołębiewska A., Waśko I., Ronkiewicz P., Markowska M., Hryniewicz W.: Inwazyjna choroba pneumokokowa w Polsce w roku 2010. *Pol. Merk. Lek.* **31**, 80–85 (2011)
82. Skoczyńska A., Hryniewicz W.: Genetic relatedness, antibiotic susceptibility, and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* responsible for meningitis in Poland, 1997–2001. *Microb. Drug Resist.* **9**, 175–182 (2003)
83. Sleeman K.L., Daniels L., Gardiner M., Griffiths D., Deeks J.J., Dagan R., Gupta S., Moxon E.R., Peto T.E., Crook D.W.: Acquisition of *Streptococcus pneumoniae* and nonspecific morbidity in infants and their families: a cohort study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 121–127 (2005)
84. Spellerberg B., Cundell D.R., Sandros J., Pearce B.J., Idänpää-Heikkilä I., Rosenow C., Masure H.R.: Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **19**, 803–813 (1996)
85. Sulikowska A., Grzesiowski P., Sadowy E., Fiett J., Hryniewicz W.: Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from nasopharynges of asymptomatic children and molecular analysis of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strain replacement in the nasopharynx. *J. Clin. Microb.* **42**, 3942–3949 (2004)
86. Sulikowska A., Grzesiowski P., Taraszkiewicz M., Hryniewicz W.: Nosicielstwo nosogardłowe *Streptococcus pneumoniae* u dzieci do 5 roku życia w wybranych środowiskach w Warszawie. *Pediatr. Pol.* **78**, 377–384 (2003)
87. Swiatło E., Champlin F.R., Holman S.C., Wilson W.W., Watt J.M.: Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **70**, 412–415 (2002)
88. Syrjänen R.K., Auranen K.J., Leino T.M., Kilpi T.M., Mäkelä P.H.: Pneumococcal acute otitis media in relation to pneumococcal nasopharyngeal carriage. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 801–806 (2005)
89. Syrjänen R.K., Herva E.E., Mäkelä P.H., Puhakka H.J., Auranen K.J., Takala A.K., Kilpi T.M.: The value of nasopharyngeal culture in predicting the etiology of acute otitis media in children less than two years of age. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 1032–1036 (2006)
90. Tong H.H., Blue L.E., DeMaria T.F.: Evaluation of virulence of the *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient

- mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect. Immun.* **68**, 921–924 (2000)
91. Trotter C.L., Waight P., Andrews N.J., Slack M., Efstratiou A., George R., Miller E.: Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the pre-conjugate vaccine era: England and Wales, 1996–2006. *J. Infect.* **60**, 200–208 (2010)
 92. Trzcinski K., Thompson C., Malley R., Lipsitch M.: Antibodies to conserved pneumococcal antigens correlate with, but are not required for, protection against pneumococcal colonization induced by prior exposure in a mouse model. *Infect. Immun.* **73**, 7043–7046 (2005)
 93. Tu A.H., Fulgham R.L., McCrory M.A., Briles D.E., Szalai A.J.: Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**, 4720–4724 (1999)
 94. Turner P., Turner C., Jankhot A., Helen N., Lee S.J., Day N.P., White N.J., Nosten F., Goldblatt D.: A longitudinal study of *Streptococcus pneumoniae* carriage in a cohort of infants and their mothers on the Thailand-Myanmar border. *PLOS ONE*, **7**, e38271 (2012)
 95. Von Kries R., Siedler A., Schmitt H.J., Reinert R.R.: Proportion of invasive pneumococcal infections in German children preventable by pneumococcal conjugate vaccines. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 482–487 (2000)
 96. Watson D.A., Musher D.M., Verhoef J.: Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**, 479–490 (1995)
 97. Weiser J.N., Bae D., Fasching C., Scamurra R.W., Ratner A.J., Janoff E.N.: Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4215–4220 (2003)
 98. Weiser J.N., Markiewicz Z., Tuomanen E.I., Wani J.H.: Relationship between phase variation in colony morphology, intra-strain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immunol.* **64**, 2240–2245 (1996)
 99. Whitney C.G., Schuchat A.: Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1737–1746 (2003)
 100. Winkelstein J.A.: Complement and the host's defense against the pneumococcus. *Crit. Rev. Microbiol.* **11**, 187–208 (1984)
 101. Zhang Q., Choo S., Finn A.: Immune responses to novel pneumococcal proteins pneumolysin, PspA, PsaA, and CbpA in adenoidal B cells from children. *Infect. Immun.* **70**, 5363–5369 (2002)
 102. Zhou F., Kyaw M.H., Shefer A., Winston C.A., Nuorti J.P.: Health care utilization for pneumonia in young children after routine pneumococcal conjugate vaccine use in United States. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **161**, 1162–1168 (2007)

Joanna Nowicka^{1*}, Marzenna Bartoszewicz¹

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,
ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław

Wpłynęło w marcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Zakażenia związane z wytwarzaniem biofilmu. 3. Czynniki ryzyka powikłań infekcyjnych związane ze stosowaniem biomateriałów. 3.1. Czynniki związane z pacjentem. 3.2. Czynniki związane z zabiegiem operacyjnym. 4. Podział zakażeń wokół implantów. 5. Najczęstsze czynniki etiologiczne zakażeń związanych ze stosowaniem biomateriału. 5.1. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i inne CNS. 5.2. *Pseudomonas aeruginosa*. 5.3. *Propionibacterium acnes*. 5.4. *Streptococcus pyogenes*. 5.5 *Candida albicans*. 6. Rozpoznanie infekcji związanych ze stosowaniem biomateriałów. 7. Profilaktyka antybiotykowa okołoperacyjna. 8. Podsumowanie

Orthopedic surgery infections related to the use of biomaterials

Abstract: In spite of recent advances in diagnostics and therapy, musculoskeletal infections still remain a huge problem. Etiological agents of infections associated with the use of biomaterials on orthopedic and surgical orthopedic wards are often the microbes included in the patient's own flora and these commonly found in hospitals. The present paper discusses the risk factors and most common etiological agents of these types of infections.

1. Introduction. 2. Infections associated with biofilm formation. 3. Risk factors for complications following biomaterial-related infections. 3.1. Patient-related factors. 3.2. Surgical procedure-related factors. 4. Infections classified with regard to implants. 5. The most common etiological agents of infections associated with the use of biomaterial. 5.1. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and other CNS. 5.2. *Pseudomonas aeruginosa*. 5.3. *Propionibacterium acnes*. 5.4. *Streptococcus pyogenes*. 5.5 *Candida albicans*. 6. Detection of biomaterial-associated infections. 7. Perioperative antibiotic prophylaxis. 8. Summary

Key words: biofilm, biomaterials, orthopedic surgery infections

Słowa kluczowe: biofilm, biomateriały, zakażenia na oddziale ortopedycznym

1. Wstęp

Implantacja „elementów obcych” czyli biomateriałów do organizmu pacjenta stanowi podstawę leczenia na oddziałach urazowo-ortopedycznych.

Biomateriał to substancja albo kombinacja różnych substancji (syntetycznych lub naturalnych), która może być użyta w celu uzupełnienia lub zastąpienia tkanek narządu ruchu w celu usprawnienia ich funkcji. Może więc służyć do wytworzenia implantów, czyli umieszczonych, częściowo lub całkowicie, pod powierzchnią nabłonka przyrządów medycznych. Implant pozostający przez różny czas w organizmie człowieka, może składać się z jednego lub kilku biomateriałów [41, 67, 70].

Stosowanie w ortopedii implantów, różnego rodzaju, w wielu przypadkach umożliwia normalne funkcjonowanie pacjentów. Infekcje i stany zapalne kości i stawów dotyczą milionów ludzi na całym świecie. U osób powyżej 50-tego roku życia tego rodzaju infekcje stanowią ponad połowę wszystkich chorób przewlekłych [54]. Dla osób cierpiących np. z powodu zwyrodnienia stawu biodrowego, zastąpienie własnego stawu sztucznym czyli wprowadzenie implantu stawu biodrowego uwalnia chorego od ogromnych dolegliwości bólowych i daje szansę na poprawę standardu życia [35, 69].

Należy jednak pamiętać, o tym że tego rodzaju zabiegi niosą ze sobą ryzyko powikłań infekcyjnych.

Częstość powikłań uzależniona jest od rodzaju zabiegu. Dane literaturowe pokazują, że po endoprotezoplastyce biodra wynoszą poniżej 1% (choć niektórzy autorzy podają że od 2–3%) [69], po alloplastyce kolana poniżej 2%, geoplastyce około 10–40%, operacji zespolenia złamania zamkniętego w granicach 8–9% a po operacji zespolenia otwartego około 10% [3, 25]. Powikłania po zabiegach z pilnych wskazań są częstsze (~10%) niż po zabiegach planowanych (0,5–2,5%) [24]. W przypadku zabiegów planowanych kwalifikacja do zabiegu operacyjnego i badanie chorego odbywają się na długo przed (kilka miesięcy) zabiegiem co daje możliwość właściwej oceny stanu ogólnego chorego, przeprowadzenie odpowiednich konsultacji (reumatologicznej, diabetologicznej itp.) czy wyleczenia istniejących infekcji [69]. Do zabiegu planowanego chory jest w stanie się odpowiednio przygotować co zmniejsza ryzyko powikłań infekcyjnych.

Co ważne, zakażenia w okolicy wprowadzonych implantów ortopedycznych, często wywołane przez własną florę organizmu pacjenta, związane są przede wszystkim z wytworzeniem struktur biofilmu na powierzchni biomateriału. Tego typu zakażenia mogą pro-

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel. (71) 784 12 97; fax.71 784 01 17; e-mail: joanna.nowicka@umed.wroc.pl

wadzić do przedłużonej antybiotykoterapii, reoperacji, utraty kończyny a nawet do śmierci pacjenta [7].

Dane literaturowe pokazują, że obecnie grupą biomateriałów dość szeroko stosowaną w ortopedii są metale i stopy metali: stal austeniczna (głównie chromowo-niklowo-molibdenowa), tytan i stopy tytanu (Ti6Al4V oraz Ti6Al7Nb), czy stopy z pamięcią kształtu. Swoje zastosowanie mają również materiały kompozytowe, materiały ceramiczne czy materiały węglowe (warstwy diamentowe i diamentowopodobne). Dosyć ciekawą grupą materiałów są materiały resorbowalne, tzw. polimery resorbowalne [67, 30]. Warto zaznaczyć, że podejmowane są próby tworzenia nowych biomateriałów, które nie będą podatne na adhezję drobnoustrojów albo dokonuje się modyfikacji powierzchni już tych istniejących z zastosowaniem różnych związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [5, 61].

2. Zakażenia związane z wytwarzaniem biofilmu

Bakterie przystosowały się do życia na powierzchni implantów w wielokomórkowej strukturze otoczonej warstwą substancji organicznych i nieorganicznych. Obecnie wiele drobnoustrojów jest zdolna do wytworzenia struktur biofilmu stwarzając sobie idealne warunki do bytowania w ustroju gospodarza. Bakterie żyjące pod postacią tej „zorganizowanej społeczności” chronione są przed mechanizmami obronnymi ustroju gospodarza (zaburzone procesy chemotaksji, opsonizacji, fagocytozy, zahamowana blastogeneza komórek B i T) czy penetracją związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, szczególnie antybiotyków [43, 62].

Wytworzenie struktury biofilmu zależy w dużej mierze od zdolności adhezyjnych drobnoustroju, rodzaju biomateriału ale także od integracji implantu z tkanką (np. kostną) czyli odpowiedzi organizmu na wprowadzony biomateriał. Proces integracji jest złożony i kilkietapowy. Ważnym wydaje się adsorpcja białek – jak fibronektyna, witronektyna, osteopontyna, sialoproteiny kości, trombospontyna, kolagen typu I – na implancie, która zachodzi po kontakcie implantu z płynami ustrojowymi. Szczególną rolę odgrywają tutaj białka matrix zewnątrzkomórkowego, które umożliwiają adhezję osteoblastów i fibroblastów i znacznie wpływają na proces osteointegracji [1, 37]. Niektóre drobnoustroje mają zdolność wiązania białek macierzy zewnątrzkomórkowej i tym samym adherowania do biomateriału. Odbywa się więc specyficzny rodzaj konkurencji o powierzchnię implantu, która zachodzi między osteoblastami, fibroblastami i mikroorganizmem. Wygrana tych pierwszych doprowadzi do zahamowania adhezji bakterii, wygrana mikroorganizmów prowadzi do wytworzenia biofilmu [24, 63], co sprzyja utrzymaniu się drobnoustrojów w miejscu zakażenia

i może zaburzyć proces osteointegracji (tworzenie połączeń kość – powierzchnia implantu) [4, 71].

Tworzenie biofilmu to proces złożony, zapoczątkowany przyleganiem bakterii do „sztucznej powierzchni”. Pierwszy, odwracalny etap adhezji zapoczątkowany jest zbliżaniem się drobnoustrojów do biomateriału na odległość mniejszą niż 1 nm. Biorą w nim udział siły fizyczne, hydrofobowe, napięcia powierzchniowego czy wiązania van der Waalsa [6, 14]. W „fazie unieruchomienia” – drugi, nieodwracalny etap – zachodzi wiązanie zewnątrzkomórkowych struktur bakterii z odpowiednimi białkowymi receptorami komórkowymi. W kolejnych fazach następuje pobudzenie zaadherowanych mikroorganizmów do rozmnażania (trzeci etap) i wytwarzanie zewnątrzkomórkowego śluzu (czwarty etap) czyli substancji o charakterze polimerów, co w konsekwencji prowadzi do wytworzenia struktur biofilmu [6, 73]. Niektóre mikroorganizmy opuszczają utworzony biofilm, kolonizują inną powierzchnię dążąc do wytworzenia struktur biofilmu w zupełnie innym, nowym miejscu [6], co może prowadzić do zakażeń narządowych i ogólnoustrojowych [43].

Infekcje okołoprotezowe i wytworzenie struktur biofilmu mogą doprowadzić do procesu obłuzowania protezy, będący konsekwencją osteolizy tkanki kostnej w najbliższym sąsiedztwie biomateriału [64]. Za taki stan odpowiedzialne są zaktywowane, przez cytokiny, osteoklasty. W ich aktywacji ważną rolę odgrywają, między innymi, wydzielane w odpowiedzi na infekcję bakteryjną interleukina-1 czy czynnik martwicy nowotworów [64]. Istotne są również wydzielane przez drobnoustroje substancje, szczególnie zewnątrzkomórkowe (LPS, leukotoksyny, cytolizyny), które poprzez oddziaływanie na komórki układu immunologicznego ustroju gospodarza mogą doprowadzić do zapalnego procesu ropnego [64].

Postępujące zakażenie w okolicy implantu może niszczyć kość w miejscu kontaktu z implantem, najczęściej poprzez rozwój ziarniny zapalnej [24].

Najczęstsze objawy infekcji toczącej się w okolicy wprowadzonego biomateriału to ból stawu, obecna treść ropna i stan zapalny tkanek w okolicy implantu, obecność przetoki, gorączka, w badaniu RTG widoczne obłuzowanie [63]. Czasami jedynym objawem jest ból stawu czy obłuzowanie protezy [27]. Septyczne obłuzowanie protezy wydłuża proces leczenia, może doprowadzić do wymiany lub usunięcia endoprotezy, amputacji kończyny czy nawet śmierci pacjenta [64].

3. Czynniki ryzyka powikłań infekcyjnych związane ze stosowaniem biomateriałów

Częstość zakażeń mających związek ze stosowaniem biomateriałów zależy w dużej mierze od czynników zależnych od pacjenta ale również z wykonywanym

zabiegiem, a tu szczególnie istotne są właściwe przygotowanie pacjenta (głównie pola operacyjnego) przed zabiegiem, oraz właściwe przygotowanie operatora [38].

3.1. Czynniki związane z pacjentem

Nie bez znaczenia jest ogólny stan fizjologiczny pacjenta (waga, wiek, niedożywienie lub otyłość, palenie papierosów). Zmniejszona wydolność układu immunologicznego u osób starszych (powyżej 65 roku życia) sprzyja zakażeniom. Podobnie wpływa stan odżywienia i waga pacjenta: niedożywienie czy otyłość czynią organizm bardziej podatny na powikłania infekcyjne poprzez zaburzoną syntezę kolagenu i białek biorących udział w mechanizmach odpornościowych ustroju gospodarza [59]. Skąpe unaczynienie tkanki tłuszczowej uwalniającej cytokiny prozapalne sprzyja zakażeniom jak również niski poziom albuminy w surowicy będący wyznacznikiem ciężkiego niedożywienia [23].

Istotne są również choroby towarzyszące, takie jak zaburzenia metaboliczne. Cukrzyca trzykrotnie zwiększa ryzyko zakażenia [8, 23]. Kontrola poziomu cukru w trakcie zabiegu operacyjnego może być kluczowa dla zapobiegania powikłaniom infekcyjnym [8]. James i wsp. wykazali, że otyłość jak i cukrzyca zwiększają ryzyko infekcji okołoprzeczowych. Badacze zanalizowali 7181 przypadków operacji pierwotnej wymiany stawu biodrowego i kolanowego przeprowadzonych z powodu choroby zwyrodnieniowej stawów. Częstość infekcji okołoprzeczowych była większa u osób z nadwagą (4,66%) w porównaniu do osób z normalną masą ciała (0,37%). Zaobserwowano także, że u osób z przedoperacyjnym poziomem glukozy $\geq 6,9$ mmol/L tego rodzaju infekcje występowały częściej niż u osób z poziomem glukozy $< 6,9$ mmol/L [28]. Cukrzyca zdiagnozowana podczas zabiegu operacyjnego około dwukrotnie zwiększała ryzyko infekcji, przy czym częściej infekcje występowały u pacjentów poddanych wymianie stawu kolanowego niż biodrowego [28].

Choroby nowotworowe, leczenie immunosupresyjne czy inne choroby zaburzające funkcjonowanie układu immunologicznego osłabiają znacznie odporność ustroju gospodarza [59]. Ponadto wyżej wymienione choroby mogą zmieniać stan odżywienia komórek (w okolicy rany) częściowo przez obniżenie perfuzji tkankowej [59]. Obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu w tkankach (poniżej 30 mmHg) sprzyja rozwojowi zakażenia poprzez osłabienie aktywności makrofagów i leukocytów [38].

Powikłaniom sprzyjają choroby reumatoidalne (reumatoidalne zapalenie stawów), choroby tkanki łącznej czy naczyń włosowatych. Nie bez znaczenia są również niewydolność wątroby czy nerek [3]. Endoprotezoplastyka u pacjentów w schyłkowej niewydolności nerek wiąże się z dużym ryzykiem powikłań co

wynika z zaburzeń wodno-elektrolitowych, zaburzeń metabolicznych, towarzyszących chorób układu krążenia i zaburzonym funkcjonowaniu układu immunologicznego czyli większej podatności na infekcje [60].

Palenie tytoniu zaburza funkcjonowanie układu immunologicznego, zarówno mechanizmów odporności humoralnej jak i komórkowej. Należy pamiętać o tym, że choroby przewlekłe, będące konsekwencją długotrwałego palenia, zwiększają ryzyko różnych powikłań (układu krążenia, nerwowego, oddechowego), mogą także zaburzyć proces gojenia się ran [46], głównie poprzez obniżoną zdolność hemoglobiny do przenoszenia tlenu [23]. Palenie papierosów zwiększa częstość infekcji ran pooperacyjnych pacjentów oddziałów ortopedycznych (po zabiegach operacyjnych) w porównaniu do osób niepalących [46], osoby palące są bardziej podatne na zakażenia bakteryjne i wirusowe [57]. Abstynencja w paleniu papierosów przed zabiegiem operacyjnym obniża ryzyko powikłań infekcyjnych [23].

Nasell i wsp. przeprowadzili analizę częstości powikłań infekcyjnych pacjentów (906) poddanych leczeniu operacyjnemu z powodu ostrego złamania kostki. Podział pacjentów na palących i niepalących pokazał sześciokrotnie wyższe prawdopodobieństwo wystąpienia zakażenia rany po zabiegu operacyjnym u palących [40]. Lubbeke i wsp. wykazali silny związek pomiędzy paleniem papierosów i rewizją po całkowitej endoprotezoplastyce stawu biodrowego. Autorzy przyjmując dwa kryteria: rodzaj endoprotezy (z metalowym i ceramiczno-polietylenowym łożyskiem) oraz palenie papierosów, wykazali, że rewizja w przypadku endoprotez z metalowym łożyskiem była 4x wyższa u palących w porównaniu do pacjentów niepalących. Wykazano wysoką zależność pomiędzy paleniem a uszkodzeniem endoprotezy ale tylko z metalowy łożyskiem. Takiej zależności nie wykazano w przypadku łożyska ceramiczno-polietylenowego [34].

Ogromny wpływ na zakażenia po wprowadzeniu ciała obcego mogą mieć infekcje toczące się w organizmie pacjenta np. zakażenie układu moczowego, infekcje zębów, dziąseł, zatok, skóry. Może dojść do translokacji drobnoustrojów i wywołania zakażenia w miejscu operowanym, nawet jeżeli infekcja dotyczy narządu odległego od rany operacyjnej [66]. Bardzo niebezpieczne są procesy przewlekłe toczące się w okolicy skóry kończyn, które to niszczą barierę ochronną, jaką jest skóra, stanowią wrota wnikania dla drobnoustrojów bytujących na skórze ale także tych pochodzących ze środowiska [69]. Jeśli podczas zabiegu operacyjnego doszło do uszkodzenia przedwężłowych naczyń chłonnych, transportowane, do okolicznych węzłów chłonnych, wraz z chłonką, drobnoustroje są „zagrożeniem” dla implantu [69].

Nosicielstwo *S. aureus* w przedsionku nosa ma znaczenie w pooperacyjnych powikłaniach. Szacunkowo

ocenia się, że w Polsce 20–40% populacji to nosiciele *S. aureus*, wśród personelu medycznego odsetek ten jest jeszcze większy i może sięgać nawet 90% [66].

Chorzy u których stwierdzono obecność gronkowca złocistego w przedsionku nosa muszą być poddani eradycji *S. aureus* z zastosowaniem maści mupirocynowej, a każda infekcja powinna być wyleczona.

Kolonizacja szczepami szpitalnymi (przy długiej hospitalizacji) może mieć istotny wpływ na zakażenie. Skóra jest podatna na osiedlanie się flory przejściowej co w przypadku „układu” pacjent-środowisko szpitalne może mieć kluczowe znaczenie. Bakterie wchodzące w skład flory przejściowej, a pochodzące ze środowiska szpitalnego, są odporne na antybiotyki, często wielooporne. Źródłem drobnoustrojów są, w tym przypadku głównie środowisko ale także personel czy inni pacjenci. Już po 48 h skóra chorego jest kolonizowana przez drobnoustroje środowiska szpitalnego a ryzyko wystąpienia zakażenia wzrasta wraz z wydłużeniem się czasu pobytu pacjenta w szpitalu przed zabiegiem [59].

Pedersen i wsp. analizując czynniki ryzyka infekcji po endoprotezoplastyce stawu biodrowego wykazali zwiększoną częstość infekcji u mężczyzn. Często ze względu na większy stopień urazu chirurgicznego i martwicy tkanek mężczyźni są bardziej narażeni na infekcję aniżeli kobiety. Współistnienie u mężczyzn takich chorób jak udar, choroby wątroby, cukrzyca, rak zwiększa ryzyko zakażenia protezy stawu biodrowego [48].

3.2. Czynniki związane z zabiegiem operacyjnym

Niewątpliwie bardzo istotnym czynnikiem mającym wpływ na zakażenia jest właściwe, lub bardziej należałoby powiedzieć, niewłaściwe przygotowanie pola operacyjnego.

Częstymi czynnikami etiologicznymi zakażeń związanych z wprowadzeniem biomateriałów są drobnoustroje wchodzące w skład flory fizjologicznej pacjenta, zarówno stałej jak i wspomnianej wcześniej flory przejściowej. *S. epidermidis* wiecie tutaj prym i wymieniany jest jako jeden z najczęstszych czynników etiologicznych tego typu zakażeń. Skórę człowieka pokrywają drobnoustroje w ilości 10^2 – 10^6 kom./cm². Bakterie tlenowe i względnie beztlenowe pokrywają warstwę rogową naskórka, bakterie beztlenowe dominują w głębszych warstwach mieszków włosowych i gruczołów łojowych. Antyseptyka skóry jest konieczna ponieważ doprowadza do zmniejszenia liczby drobnoustrojów ale należy pamiętać o tym, że nie usunie stałej flory pacjenta całkowicie. Proces odnowy flory fizjologicznej skóry może stanowić problem przy zabiegach długotrwałych, wielogodzinnych, z którymi często mamy do czynienia na oddziałach ortopedycznych [66, 39]

Dzień przed zabiegiem i w dniu operacji pacjent powinien zażyć kąpeli całego ciała z zastosowaniem preparatów do dezynfekcji skóry [45].

Czynnikiem sprzyjającym zakażeniom może być zbyt wczesne mechaniczne usuwanie owłosienia przed zabiegiem operacyjnym [59]. Jest ono konieczne, może jednak sprzyjać wnikaniu drobnoustrojów obecnych na skórze pacjenta czy z rąk personelu poprzez tworzenie mikrouszkodzeń skóry. Sprzyja także rozwojowi zakażeń skóry. Usuwanie owłosienia powinno się odbyć w dniu zabiegu, tuż przed operacją. Im więcej czasu minie od momentu usunięcia owłosienia do wykonania zabiegu operacyjnego tym ryzyko zakażenia będzie większe (tuż przed operacją – ryzyko zakażenia rzędu 3%; więcej niż 24 h przed zabiegiem operacyjnym – ryzyko zakażenia 20%) [8]. Niektórzy autorzy zamiast golenia, zalecają depilację (najlepiej chemiczną) lub strzyżenie [59].

Właściwe „przygotowanie operatora” do zabiegu operacyjnego, a szczególnie mycie chirurgiczne rąk, to kolejna ważna kwestia w temacie zakażeń. Dłonie operatora to ważne „źródło” drobnoustrojów wywołujących zakażenia miejsca operowanego, dlatego zbyt krótkie i niewłaściwe mycie rąk zwiększa ryzyko zakażenia [8]. Chirurgiczne mycie rąk powinno być prowadzone najlepiej z użyciem alkoholowego płynu do dezynfekcji rąk o przedłużonym działaniu.

Ponieważ szacunkowo 25% rękawiczek ulega rozszczelnieniu już po 20 minutach trwającego zabiegu operacyjnego, według WHO, należy również zmieniać rękawiczki w trakcie operacji po 2–3 godzinach [38, 8].

Zabieg operacyjny, szczególnie długotrwały, podwyższa ryzyko zakażenia tym bardziej jeżeli towarzyszy temu utrata dużej ilości krwi. Tkanka niedotleniona, martwica to idealne miejsce do namnażania się drobnoustrojów, szczególnie beztlenowych [59, 72]. Poza tym wraz z wydłużaniem się czasu trwania zabiegu operacyjnego rośnie ryzyko zanieczyszczenia rany drobnoustrojami [59], które mogą pochodzić, np. z sali operacyjnej (system klimatyzacyjny może być źródłem drobnoustrojów), od operatorów i innych członków wchodzących w skład zespołu operującego (nie bez znaczenia jest ilość osób na sali operacyjnej) czy narzędzi chirurgicznych (np. nóż chirurgiczny) [23, 63, 64].

Warto może zaznaczyć, że dostanie się drobnoustrojów na ranę nie jest równoznaczne z infekcją ale tylko wtedy kiedy prawidłowo działa układ immunologiczny. Zaburzone funkcjonowanie mechanizmów obronnych ustroju gospodarza może doprowadzić do rozwinięcia pełnoobjawowego zakażenia [69].

4. Podział zakażeń wokół implantów

Zakażenia ujawniające się do miesiąca od zabiegu operacyjnego określamy mianem wczesnych (ostrzych), ujawniające się do 2 lat od zabiegu – późnych (przewlekłych), natomiast te które ujawniają się powyżej 2 lat od zabiegu operacyjnego określane są jako późne, krwiopochodne [4, 66]. Za zakażenia wczesne odpowiedzialne

są drobnoustroje pochodzące najczęściej ze środowiska, zanieczyszczające implanty (np. endoprotezę czy śruby do zespolenia kości) w trakcie trwającego zabiegu operacyjnego (zakażenia egzogenne, zewnątrzpochodne). Za zakażenia późne często odpowiedzialne są drobnoustroje pochodzące z innych ognisk infekcji organizmu człowieka, np. infekcji układu moczowego (zakażenia endogenne, wewnątrzpochodne). Infekcje późne, krwiopochodne często ujawniają się po długim czasie odpowiedniego funkcjonowania implantu [4].

Podział na zakażenia ostre, przewlekłe i powolne (późne) opiera się na nasileniu objawów klinicznych podczas zakażenia [4]. Infekcja późna to rodzaj zakażenia przewlekłego (słabo zaznaczone objawy kliniczne infekcji) z objawami powolnego obłuzowania endoprotezy [66]. Zakażenie wczesne charakteryzuje się dobrze zarysowanymi objawami (przetoka drenująca, rozejście się rany, zaburzone gojenie rany, ból stawu, podwyższona temperatura) i na ogół nie jest trudne do rozpoznania. W przeciwieństwie do zakażeń o charakterze przewlekłym, w którym, z powodu zmienionego metabolizmu bakterii bytujących w strukturze biofilmu, objawy są nietypowe, niespecyficzne a także słabo zaznaczone (np. ból stawu) [27, 66].

5. Najczęstsze czynniki etiologiczne zakażeń związanych ze stosowaniem biomateriału

Tego typu infekcje najczęściej wywołane są przez drobnoustroje wchodzące w skład flory fizjologicznej skóry: gronkowce, zarówno CNS (przede wszystkim *S. epidermidis*) jak i *S. aureus* dominują – ogółem są przyczyną 50–70% tego typu infekcji [3].

Gronkowce koagulazoujemne są przyczyną ok. 40% zakażeń związanych ze stosowaniem endoprotez a *S. aureus* odpowiada za 10–20% tego rodzaju infekcji [63].

Za około 20% zakażeń odpowiadają paciorkowce (głównie β -hemolityczne), 15–20% pałeczki Gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp.) a także *P. aeruginosa*. Inne drobnoustroje: *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Propionibacterium* spp. izolowane są znacznie rzadziej (ok 7–10% zakażeń) [27].

Za 1% infekcji okołoprotezowych odpowiadają grzyby [59]. Od 4–27% zakażeń może być wywołana jednocześnie przez różne drobnoustroje (charakter mieszany) [63].

5.1. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i inne CNS

Za ogromne zdolności adhezyjne gronkowców, czyli pierwszy etap tworzenia biofilmu, odpowiadają związane kowalencyjnie z peptydoglikanem białka

powierzchniowe określane mianem MSCRAMM (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). Umożliwiają one adhezję gronkowców do białek macierzy komórkowej gospodarza (fibronektyny, fibrynogenu, elastyny, kolagenu i witronektyny) [18, 55]. Ponieważ biomateriał w ustroju gospodarza zostaje pokryty przez białka pochodzące z osocza lub tkanki łącznej [18] a białka MSCRAMM, mają zdolność wiązania białek ECM (extracellular matrix proteins) możliwa jest adhezja do biomateriału [18, 43]. Dobrze poznanym białkiem MSCRAMM u gronkowców jest białko wiążące fibrynogen (SdrG u *S. epidermidis* i ClfA u *S. aureus*) [36], białko wiążące kolagen (SdrF) u *S. epidermidis* [18] oraz białko wiążące fibronektynę (FnBPA i FnBPB u *S. aureus*, Embp u *S. epidermidis*) [10, 21, 22].

SdrG (119 kDa) i ClfA (118 kDa) inicjują przyleganie do powierzchni opłaszczonych fibrynogenem [18]. SdrG ma dodatkowo zdolność do agregacji płytek krwi [18]. Domena A tego białka składa się z trzech poddomen N1, N2 i N3 a rejon wiążący ligand znajduje się między domeną N2 i N3. Białko wiążące fibrynogen (SdrG/Fbe) *S. epidermidis* łączy się z łańcuchem β fibrynogenu według mechanizmu „dock, lock and latch” [58]. ClfA u *S. aureus* składa się również z trzech poddomen (N1, N2 i N3), domeny N2N3 odpowiadają za wiązanie fibrynogenu. Nie wiadomo jaka jest struktura i rola poddomeny N1. McCormac i wsp. przypuszczają, że poddomena ta wpływa na transport i powierzchniową lokalizację ClfA [36].

SdrF, składa się z wiążącej ligand domeny A oraz z domeny B. W domenie A podobnie jak u wyżej wymienionych białek można wyróżnić 3 poddomeny, a miejsce wiążące ligand znajduje się na domenie N2 [2].

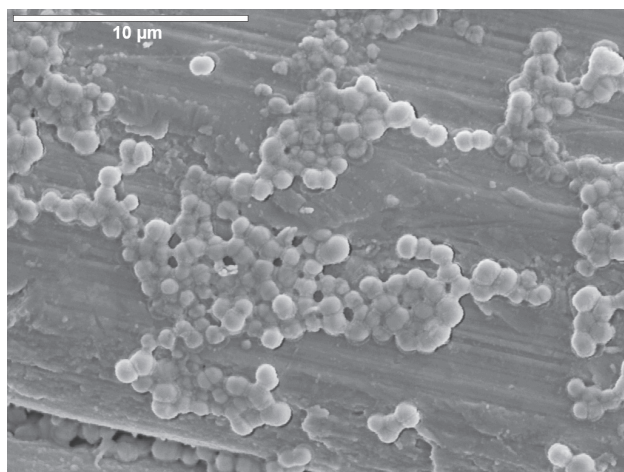
FnBPA i FnBPB promują tworzenie biofilmu przez niektóre metycylinooporne szczepy *S. aureus* [21, 22]. U białek wiążących fibronektynę stwierdzono podobną budowę jak u ClfA, i również wiązanie z odpowiednim ligandem odbywa się z udziałem poddomeny N2 i N3 [22].

U *S. epidermidis* stwierdzono obecność białka wiążącego fibronektynę Embp. Jest to duże białko, 420 kDa, które bierze udział w pierwszym etapie tworzenia biofilmu, ale także chroni *S. epidermidis* przed fagocytozą w makrofagach [10, 49]. Udział tego białka w tworzeniu biofilmu i dodatkowo ochrona przed mechanizmami obronnymi ustroju gospodarza czyni to białko ważnym markerem chorobotwórczości w zakażeniach związanych z wprowadzeniem implantów. Christner i wsp. odkryli, że izoforma Embp wiąże fibronektynę, a także może zapoczątkować akumulację biofilmu przez *ica*-ADBC i *aap*-negatywne izolaty [18].

W proces tworzenia biofilmu gronkowców oprócz wyżej wymienionych białek zaangażowane są również

inne adhezyny. Między innymi: białka SSP-1 i SSP-2 (Staphylococcal Surface Proteins) [20], adhezyna AtlE (autolysin E), adhezyna Aae (autolysin/adhesin Aae) [49, 43]. Autolizyna AtlE, o masie 140 kDa, wiąże witronektynę [74, 53] i reguluje pierwszy etap adhezji. Mechanizm działania związany jest najprawdopodobniej z oddziaływaniem hydrofobowym z powierzchnią nieożywioną [6]. Adhezyna ta składa się z powtarzalnej sekwencji aminokwasów i zawiera dwie domeny, amidazową i N-acetyloglukozamidazową, o aktywności enzymatycznej [6].

Istotną rolę podczas kolonizacji powierzchni biomateriałów przez gronkowce odgrywa śluz wytwarzany przez te drobnoustroje [73, 19]. Śluz chroni również drobnoustroje przed mechanizmami ochronnymi ustroju gospodarza, umożliwiając przeżycie gronkowców w zakażonym organizmie [73] (Rys. 1).



Rys. 1. Biofilm *S. epidermidis* utworzony na tytanowym wkręcie do kości korowej. Mikroskop elektronowy (powiększenie 5000x).

W procesie akumulacji (druga faza tworzenia biofilmu) i produkcji śluzu przez gronkowce ogromną rolę odgrywa polisacharydowy antygen PIA (polysaccharide intercellular antigen) – produkt ekspresji operonu *icaADBC* [17, 44]. Ekspresja genów *icaA*, *icaD* oraz *icaC* jest konieczna dla syntezy polisacharydowego antygeny [16]. PIA to β -1,6-glukozaminoglikan zbudowany z 130 reszt β -1,6-N-acetylo-D-glukozaminy (β -1,6-GlcNAc) oraz ze składających się na frakcję anionową nieacetylowane reszty D-glukozaminy (fosforanu i reszty bursztynianu) [6]. Antygen ten odpowiada między innymi za elektrostatyczne interakcje pomiędzy bakteriami i wydaje się, że jego rola jest kluczowa w tworzeniu biofilmu gronkowcowego ale nie zawsze konieczna. Jak pokazują badania niektórych autorów, kliniczne szczepy *S. epidermidis*, odpowiedzialne za zakażenia związane z tworzeniem biofilmu, tylko w 33–52% są *icaADBC* pozytywne [50, 56]. W literaturze opisano także szczepy *S. aureus* zdolne do tworze-

nia biofilmu u których nie wykryto obecności genów operonu *ica* [33]. Przypuszcza się że, u takich szczepów (*ica*-negatywnych) w tworzenie biofilmu na tym etapie zaangażowane są białko Aap (accumulation-associated protein) u *S. epidermidis* i jego „odpowiednik” SasG (Staphylococcus aureus surface protein G) u *S. aureus*. Wydaje się, że białka te przejmują funkcję PIA [33].

Białko Aap, o masie 220-kDa zawiera N-terminalną domenę B i domenę A i najprawdopodobniej odgrywa rolę w zapoczątkowaniu adhezji lub we wczesnym etapie dojrzewania biofilmu [18]. Może o tym świadczyć fakt, że przy zastosowaniu poliklonalnych przeciwciał anti-Aap w stosunku do wzorcowego szczepu *S. epidermidis* RP62A, produkującego PIA, zaobserwowano zahamowanie w 87% tworzenia biofilmu [18]. SasG, odpowiednik białka Aap u *S. aureus* promuje tworzenie biofilmu niezależnie od PIA i najprawdopodobniej odgrywa rolę w fazie akumulacji a nie w fazie przylegania [21].

Tworzenie biofilmu i akumulację, przy nieobecności PIA, może indukować również białko Bap (biofilm-associated protein) lub jego homolog BhP (biofilm-associated protein homolog). Obecność białka Bap stwierdzono u szczepów *S. aureus* izolowanych od krów z mastitis, natomiast obecność BhP udało się wykazać u szczepów *S. epidermidis* pochodzących od ludzi [33]. Wykazano, że białko BhP indukuje tworzenie biofilmu i akumulację przy nieobecności PIA [18, 49]. Warto dodać, że białko Aap wytwarzane jest przez prawie 90% szczepów *S. epidermidis*, podczas gdy białko BhP przez około 15–45% izolatów [18].

Ważne dla odpowiedniego funkcjonowanie biofilmu, za przebieg wielu procesów metabolicznych drobnoustrojów tworzących biofilm odpowiedzialne są autoinduktory (cząsteczki sygnałowe) dzięki którym drobnoustroje „porozumiewają” się ze sobą. Swobodna dyfuzja cząsteczek sygnałowych między komórkami bakteryjnymi pozwala na komunikację ale również na określenie liczebności komórek w biofilmie. Takie zjawisko określane jest w literaturze jako QS – quorum sensing i polega na uzależnieniu ekspresji genów od zagęszczenia, czyli liczebności komórek drobnoustrojów w populacji [6, 32]. Rolę cząsteczek sygnalizacyjnych u bakterii G-dodatnich, w tym u gronkowców, pełnią oligopeptydy. Gronkowiec złocisty może „wykorzystywać” wyżej wymieniony mechanizm, między innymi, do regulowania wytwarzania białka wiążącego kolagen i białka wiążącego fibronektynę. Ważne wydają się tu dwa loci regulatorowe: system agr (accessory gene regulator) i system sar (staphylococcal accessory gene regulator) [31].

Istotne są również dwuskładnikowe systemy regulacyjne odpowiedzialne za komunikację pomiędzy komórkami drobnoustrojów. Nie do końca poznano mechanizmy działania wszystkich tych systemów ale

ich rola w tworzeniu biofilmu wydaje się bezsporna. U *S. aureus* odkryto 17 takich systemów, a najważniejsze z nich to: ArlRS, GraRS, WalKR, LytSR i SaeRS. Ten ostatni wykryto również u *S. epidermidis* [42].

5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

U pałeczek *Pseudomonas aeruginosa* w pierwszym etapie tworzenia biofilmu, czyli przylegania do powierzchni, ważną rolę odgrywa zdolność ruchu tych drobnoustrojów. Zmiany w genach kodujących ruch skutkują trudnościami w tworzeniu struktur biofilmu – szczepy z defektem poruszania się nie są w stanie tworzyć warstwy pojedynczych komórek (monolayer) na powierzchni. W początkowej fazie tworzenia biofilmu biorą również udział fimbrie, szczególnie typu I i IV [6]. Najprawdopodobniej zdolność ruchu wynikająca z obecności rzęsek, ma znaczenie w promowaniu adhezji a obecność fimbrii typu IV jest kluczowa dla międzykomórkowej agregacji [16].

Głównym składnikiem egzopolisacharydu pałeczek ropy błękitnej jest kwas alginianowy (β -1,4-Dmannuronowy) oraz C-5 epimer kwasu guluronowego. Wytwarzanie kwasu alginianowego pozostaje pod kontrolą genu *algACD*. Gen *algC* jest kluczowy w produkcji kwasu alginianowego, jego aktywacja odbywa się podczas tworzenia biofilmu na fazie stałej [13, 16]. Proces aktywacji rozpoczyna już się 15 minut po osadzeniu pałeczek na stałej powierzchni, rośnie w ciągu kolejnych 2 godzin i następnie zaczyna spadać. Ekspresja genu *algC* u tych pałeczek *P. aeruginosa* które tworzą biofilm jest znacznie większa, prawie dziewiętnaście razy, w porównaniu do pałeczek które występują w formie planktonowej [13, 16]. Te pałeczki ropy błękitnej u których nie dochodzi do ekspresji wyżej wymienionego genu posiadają większą zdolność oddzielenia się od struktury biofilmu [6, 16].

Na dojrzewanie biofilmu u tych pałeczek mają wpływ acylowane laktony homoseryny, których wytwarzanie pozostaje pod kontrolą genów *lasI*. Szczepy *P. aeruginosa* z mutacją w genach *lasI* nie są zdolne do wytworzenia właściwych struktur biofilmu. Synteza pozakomórkowej cząsteczki sygnałowej N-(3-okso-dodekanylo)-laktonu homoseryny (3-okso-C₁₂-AHL) pozostaje pod kontrolą produktów genu *lasI*. Gdy w środowisku pałeczek *P. aeruginosa* stężenie laktonu rośnie zostaje on pobrany przez bakterie i połączony z 3-okso-C₁₂-AHL z aktywatorem transkrypcji LasR.

Działanie systemu składającego się z białka regulatorowego RhIR i autoinduktora N-butyrylolaktonu homoseryny (C₄-AHL) oparte jest na takiej samej zasadzie – gdy stężenie cząsteczki C₄-AHL będzie odpowiednio wysokie nastąpi jej wnikanie do komórki i połączenie z aktywatorem transkrypcji (RhI).

W obu przypadkach połączenie z aktywatorem transkrypcji doprowadza do powstania kompleksów, które mają zdolność aktywowania ekspresji wielu genów u pałeczek *P. aeruginosa* [6].

5.3. *Propionibacterium acnes*

Zakażenia wywołane przez *P. acnes*, który stanowi florę fizjologiczną skóry (występują w miejscach bogatych w gruczoły łojowe: czoło, skrzydełka nosa, klatka piersiowa, plecy) dotyczą głównie młodych ludzi u których drobnoustroj ten odpowiedzialny jest za zapalenie mieszków włosowych, czyli trądzik pospolity. Coraz częściej mówi się o tym, że jest to również ważny czynnik etiologiczny zakażeń związanych ze stosowaniem biomateriałów [66].

W 2003 roku wykazano, że ta beztlenowa pałeczka, może tworzyć biofilm, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, i że komórki w strukturze biofilmu są bardziej odporne na antybiotyki aniżeli te występujące w formie planktonowej [52]. Większe zdolności do produkcji biofilmu obserwuje się w przypadku tych szczepów, które pochodzą z głębokich zakażeń inwazyjnych, aniżeli tych pochodzących ze skóry od zdrowych osób [26]. Obecnie niewiele wiadomo na temat mechanizmów, genów i czynników mających wpływ na jego tworzenie, niewiele wiadomo również na temat składu chemicznego utworzonej struktury biofilmu. Aktywność enzymatyczna *P. acnes* wpływa znacznie na proces kolonizacji a także rozprzestrzeniania się procesu chorobowego. Ważną rolę w tym względzie odgrywa między innymi lipaza, której zwiększone wytwarzanie stwierdzono w fazie wzrostu biofilmu [11, 26, 66]. Poza tym u *P. acnes* stwierdzono obecność genów kodujących UDP-N-acetylo-glukozaminy-2-epimerazy i glikozylotransferazy a wiedząc, że biofilmy różnych drobnoustrojów w większości składają się z węglowodanów można przypuszczać, że geny te u *Propionibacterium* mają udział w tworzeniu biofilmu [26].

Badania pokazują, że jak w przypadku innych drobnoustrojów tak i tutaj zdolność tworzenia biofilmu związana jest ze składem podłoża wzrostowego. Pozwala to przypuszczać, że aktywacja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie składników biofilmu i w tym przypadku podlega wpływom środowiska [26]. Wykazano również, że osocze ludzkie działa hamująco na tworzenie biofilmu przez *P. acnes*. Jaki jest tego mechanizm i które składniki osocza ludzkiego mają działanie hamujące pozostaje pod znakiem zapytania.

5.4. *Streptococcus pyogenes*

Zdolności adhezyjne paciorkowców w dużej mierze wynikają z budowy ściany komórkowej tych drobnoustrojów. Obecność w ścianie komórkowej kwasu

lipoteichoju, który odgrywa ważną rolę w fizjologii bakterii i właściwym ich „funkcjonowaniu”, przyczynia się również do nadania im hydrofobowych właściwości powierzchni, co jak wiadomo ma znaczenie w adhezji do struktur zarówno żywych jak i nieżywych [65].

Istotne są również inne, ważne komponenty ściany komórkowej tych drobnoustrojów czyli białka powierzchniowe. U *Streptococcus pyogenes*, najważniejszego czynnika etiologicznego zakażeń u ludzi z tej grupy paciorkowców [65, 66], określane są one częstą mianem – rodzina białek M [12]. Najważniejszą rolę odgrywa tutaj białko M, kodowane przez gen *emm*, typowo-swoiste białko występujące przede wszystkim u szczepów zjadliwych. Przez niektórych uważane za najważniejszy wyznacznik chorobotwórczości *S. pyogenes*. Białko to o α -helikalnej budowie, zakotwiczone jest w ścianie komórkowej bakterii za pomocą C-końca a transportowane na zewnątrz komórki przy udziale sortazy [65]. W literaturze opisanych jest około 90 serotypów tego białka [65]. Białko to chroni *S. pyogenes* przed mechanizmami obronnymi ustroju gospodarza, głównie przed fagocytozą, ma swój udział w przebiegu wielu postaci klinicznych zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje, wpływa między innymi na rozwój paciorkowcowego wstrząsu toksycznego.

Poza białkiem M ważne są M-podobne białka powierzchniowe a tu szczególnie białko Mrp (M-related protein) i białko Enn (another M-like protein). Kompleks genów obejmujący nadrodzinę genu *emm* koduje wytwarzanie białek M-podobnych [12].

Nie do końca jest poznany mechanizm wpływu rodziny białek M na proces tworzenia biofilmu. Wiadomo że białko M jest w stanie tworzyć kompleksy z kwasem lipoteichoju co w znacznym stopniu potęguje silne właściwości hydrofobowe powierzchni komórek paciorkowców i nasila ich zdolności adhezyjne. Przypuszcza się, że białka te mogą również potęgować interakcję, poprzez N-końiec, pomiędzy komórkami paciorkowców i promować ich agregację [12, 65].

Istotną rolę w procesie tworzenia biofilmu odgrywa inna struktura powierzchniowa czyli otoczka składająca się z kwasu hialuronowego [65]. Badania Cho i wsp. wykazały, że kwas hialuronowy otoczki nie jest wymagany w pierwszym etapie tworzenia biofilmu ale najprawdopodobniej jego obecność istotna jest w fazie agregacji i dojrzewania jego struktur [9, 65].

Istotne w procesie tworzenia biofilmu, ale również w patogenezie wielu zakażeń wywołanych przez paciorkowce są dwuskładnikowe systemy regulacyjne. Ważną rolę odgrywa tutaj system CovRS (inna nazwa CsrRS) wykryty po raz pierwszy u *S. pyogenes*. System ten odpowiedzialny jest za ekspresję wielu genów związanych z chorobotwórczością tych drobnoustrojów, m.in. genów: *ska* (streptokinase), *sagA* (streptolysin S), *speB* (cyste-

inę protease B) a także operonu *has* (hyaluronic acid capsule synthesis). Inaktywacja genu *covR* powoduje utratę szczepu do zdolności tworzenia biofilmu [42].

5.5. *Candida albicans*

W literaturze jest wiele doniesień i opracowań na temat tworzenia biofilmu przez bakterie, niewiele jest natomiast danych dotyczących tworzenia biofilmu przez grzyby a obecnie wiadomo, że grzyby szczególnie rodzaju *Candida* mają zdolność do tworzenia jego struktur. Tak jak u bakterii jest to proces wieloetapowy.

W procesie tworzenia biofilmu u *C. albicans* można wyróżnić kilka faz, najczęściej: wczesną, pośrednią i dojrzewania [15, 47].

W trwającej do 11 godzin fazie wczesnej można zaobserwować adhezję, czyli przyleganie komórek grzyba do sztucznej powierzchni. Mikrokolonie można zaobserwować po ok. 3 godzinach, po ok. 4 komórki grzyba zaczynają filamentować co doprowadza do tworzenia pseudostrzępek i strzępek. Strzępki sąsiadujących ze sobą mikrokolonii zaczynają się łączyć, doprowadzając do uzyskania sieci przestrzennej składającej się z wzajemnie przenikających się nitkowatych form. W proces adhezji zaangażowane są adhezyny na powierzchni komórek grzyba, które rozpoznają odpowiednie receptory w ustroju gospodarza (np. fibrynogen, kolagen, elastyna, laminina, witronektyna) i tak jak u bakterii na tym etapie biorą udział nieswoiste oddziaływania, jak wiązanie Van der Waalsa, elektrostatyczne czy napięcia powierzchniowego. Zdolności adhezyjne mogą zmieniać się zależnie od warunków hodowli i rodzaju zastosowanego podłoża [68]. Czynniki ułatwiającymi tworzenie stabilnych połączeń między komórką grzyba a biomateriałem są białka ustroju gospodarza, które pokrywają wprowadzony do organizmu implant.

W fazie pośredniej, następuje wydzielanie zewnątrzkomórkowej macierzy, która składa się głównie z polisacharydów ściany komórkowej.

W ostatniej fazie obserwuje się natomiast znaczny przyrost substancji pozakomórkowych, które całkowicie otaczają komórki grzyba. Grubość dojrzałego biofilmu zawiera się pomiędzy 60–350 μm a czas potrzebny na jego wytworzenie wynosi ok. od 72 do 96 godzin [15, 29]. Na utworzoną błonę biologiczną składają się różne formy morfologiczne grzyba zanurzone w macierzy zewnątrzkomórkowej (głównie białka, polisacharydy, węglowodany). Kluczowym czynnikiem w formowaniu biofilmu jest regulator białkowy *Efg1* [51].

W wytwarzaniu biofilmu *Candida albicans* ważną rolę odgrywają autoinduktory produkowane przez te drobnoustroje. Najlepiej poznany jest farnesol, alkohol należący do terpenów. Może on uniemożliwiać dojrzewanie biofilmu poprzez zdolność oddziaływania

z receptorami komórkowymi komórek grzyba (blastospor) i zahamowanie ich przekształcenia do pseudostrzępek. Może chronić komórki przed działaniem nadtlenu wodoru a także stymulować komórki grzybów do wytwarzania chlamydospor. Inny autoinduktor tyrozol, wpływa na fazę pośrednią tworzenia biofilmu i stymuluje grzyba do wytwarzania strzępek. „Czuwa” nad spadkiem ekspresji genów niezbędnych do replikacji DNA [32].

6. Rozpoznanie infekcji związanych ze stosowaniem biomateriałów

Przy typowych objawach infekcji badanie fizykalne, zebranie dokładnych informacji na temat aktualnego stanu zdrowia pacjenta jak i zastosowanego leczenia są bardzo pomocne dla postawienia właściwego rozpoznania.

W rozpoznaniu infekcji okołoprotezowych pomocne będzie badanie mikrobiologiczne. Materiał pochodzący od pacjenta (np. płyn stawowy, wymieniany implant, fragmenty tkanek otaczające implant) posiewa się na podłoża bakteriologiczne i inkubuje w różnych warunkach – pamiętając o tym, że czynnikami etiologicznymi tego rodzaju zakażeń są drobnoustroje o różnych wymaganiach wzrostowych. Dla lepszej izolacji drobnoustrojów z utworzonego na biomateriale biofilmu zaleca się sonifikację i posiew uzyskanego płynu sonifikacyjnego, który może być również zastosowany do analiz molekularnych [63, 64].

Nie zaleca się pobieranie wymazu poprzez przetokę ponieważ hodowla w tym przypadku umożliwia identyfikację drobnoustrojów kolonizujących i uzyskania wyników fałszywie dodatnich [27].

Hodowla materiału śródoperacyjnego (tkanki zmienne zapalnie, płyn z okolicy endoprotezy, wycinki z torebki stawowej) daje możliwość identyfikacji czynnika etiologicznego zakażenia (czułość 37–61%) ale również obarczona jest ryzykiem uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Zaleca się pobranie materiału z 5–6 miejsc. Identyfikacja tego samego drobnoustroju z minimum 3 daje możliwość właściwego rozpoznania, dodatni wynik tylko z jednego miejsca jest niewystarczający do postawienia właściwej diagnozy [63, 27].

W rozpoznaniu infekcji będzie pomocne oznaczenie poziomu markerów zapalnych (CRP, OB, interleukina 6 czy prokalcytonina) [27].

Badania obrazowe nie zawsze będą pomocne, jako wstępne badanie przesiewowe może być zastosowana scyntygrafia [27].

Dosyć istotne są badania histopatologiczne i cytologiczne. W płynie stawowym oznacza się często liczbę leukocytów i granulocytów. Oznacza się również ilość leukocytów w zamrożonej tkance okołostawowej [27].

7. Profilaktyka antybiotykowa okołoperacyjna

Zapobieganie zakażeniom to właściwie stosowana antybiotykowa profilaktyka okołoperacyjna.

Antybiotyk powinien być podany na 30 minut przed rozpoczęciem zabiegu operacyjnego (nie wcześniej niż 2 godziny przed zabiegiem). Na ogół stosuje się jednorazowe podanie antybiotyku, przy zabiegu trwającym dłużej niż 3 godziny zaleca się podanie dodatkowej dawki (dożylnie). Ponieważ najczęstsze czynniki etiologiczne zakażeń związanych z wprowadzeniem implantów to gronkowce, zaleca się wybranie antybiotyku, który w swoim spektrum będzie miał te drobnoustroje. Przy wszczepieniu endoprotezy stawu biodrowego zaleca się cefazolinę, cefuroksym lub wankomycynę, którą podaje się w przypadku dużej izolacji MRSA (metycylinyoporny *S. aureus*) w oddziale lub stwierdzonego nosicielstwa MRSA u pacjenta. Przy wprowadzeniu endoprotez innych niż stawu biodrowego zaleca się cefazolinę lub wankomycynę. Cefazolinę podaje się jednorazowo, wyjątkowo można podać drugą dawkę po 8 godzinach, wankomycynę w pojedynczej dawce [3, 38].

8. Podsumowanie

Obecnie wiadomo, że prawie 95% drobnoustrojów może bytować w swoim środowisku naturalnym nie pod postacią pojedynczych komórek tylko pod postacią zorganizowanej społeczności jaką jest biofilm. Tak też jest często w ustroju gospodarza podczas toczącego się procesu chorobowego. Bakterie w biofilmie są bardziej odporne na działanie związków przeciwdrobnoustrojowych, szczególnie antybiotyków, chronione są również przed mechanizmami obronnymi gospodarza [43].

Implantacja biomateriałów (endoprotezy, wkrety) to podstawa leczenia na oddziale urazowo-ortopedycznym. Czasami jest to zabieg konieczny np. przy zespoleńiu złamania otwartego. Często zastosowanie biomateriału np. endoprotezy stawu biodrowego daje szansę chorym na normalne funkcjonowanie, poprawia jakość ich życia. Należy jednak pamiętać o tym, że obecność biomateriału niesie ze sobą ryzyko powikłań infekcyjnych, w szczególnych przypadkach zagrażających życiu [54].

Należy rozważyć czy korzyści z przeprowadzonego zabiegu np. implantacji stawu znacznie przewyższają ryzyko powikłań i związanych z tym następstw. Wszystko należy rozpatrywać indywidualnie, biorąc pod uwagę wiek pacjenta, chorobę podstawową, choroby towarzyszące a także rodzaj zabiegu jak i rodzaj biomateriału, który będzie implantowany w ustroju gospodarza.

Znajomość czynników ryzyka tego typu zakażeń, czynników etiologicznych i ich wyznaczników choro-

botwórczości jak również mechanizmów doprowadzających do wytworzenia struktur biofilmu jest konieczna do walki z tego rodzaju infekcjami.

Piśmiennictwo

1. Anselme K.: Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, **21**, 667–681 (2000)
2. Arrecubieta C., Toba F.A., von Bayern M., Akhashi H., Denga M.C., Naka Y., Lowy F.D.: SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, contributes to the initiation of ventricular assist device driveline-related infections. *PLoS Pathog.* **5**, 1–13 (2009)
3. Babiak I., Górecki A.: Zakażenia szpitalne na oddziale chirurgii ortopedycznej – pacjenci dorośli (w) Zakażenia szpitalne na oddziałach zabiegowych, red. M. Bulanda, Polskie Towarzystwo Zakażeń Szpitalnych, Kraków, 2008, s. 145–161
4. Babiak I., Kowalewski M., Szczepny G., Górecki A.: Specyfika zakażeń na oddziałach urazowo-ortopedycznych. Wskazania terapeutyczne. *Zakażenia*, **3**, 70–76 (2004)
5. Bahl S., Shreyas P., Trishul M.A., Suwas S., Chatterjee K.: Enhancing the mechanical and biological performance of a metallic biomaterial for orthopedic applications through changes in the surface oxide layer by nanocrystalline surface modification. *Nanoscale*, **7**, 7704–7716 (2015)
6. Baranowska K., Rodziejewicz A.: Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych. *Kosmos*, **57**, 29–38 (2008)
7. Bartoszewicz M., Rygiel A., Krzemiński M., Przondo-Mordarska A.: Penetracja wybranego antybiotyku i antyseptyku w biofilmie tworzonym na stalowych wszczepach stosowanych w ortopedii. *Ortop. Traumatol. Rehabil.* **3**, 310–318, (2007)
8. Bigos M., Denys A., Dutkiewicz Z., Łysakowska M., Marciniak R., Orszulak-Michalak D., Michalak J., Moczulski D., Polański A.: Zakażenia szpitalne. Wybrane zagadnienia, red. A. Denys, Wolters Kluwer Polska, Warszawa, 2012, s. 180–182
9. Cho K.H., Caparon M.G.: Patterns of virulence gene expression differ between biofilm and tissue communities of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **57**, 1545–1556 (2005)
10. Christner M., Rohde H. i wsp.: The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol. Microbiol.* **75**, 187–207 (2010)
11. Coenye T., Peeters E., Nelis H.J.: Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res. Microbiol.* **158**, 386–392 (2007)
12. Courtney H.S., Ofek I., Penfound T., Victor Nizet, Morgan A. Pence, Kreikemeyer B., Podbielski A., Hasty D.L., Dale J.B.: Relationship between Expression of the Family of M Proteins and Lipoteichoic Acid to Hydrophobicity and Biofilm Formation in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS ONE*, **4**, 1–10 (2009)
13. Czaczyk K., Myszka K.: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia*, **1**, 40–52 (2007)
14. Czaczyk K.: Factors affecting the adhesion of microorganism to solid surfaces. *Post. Mikrobiol.* **43**, 267–283 (2004)
15. Dorocka-Bobkowska B., Konopka K.: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.* **40**, 405–410 (2003)
16. Dunne W.M.: Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 155–166 (2002)
17. Esteban J., Molina-Manson D., Spiliopoulou I., Cordero-Ampuero J., Fernandez-Roblas R., Foka A., Gomez-Barrena E.: Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. *Acta Orthop.* **81**, 674–679 (2010)
18. Fey P.D., Olson M.E.: Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* **5**, 917–933 (2010)
19. Gad G.F., El-Feky M.A., El-Rehewy M.S., Hassan M.A., Abollella H., El-Baky R.M.: Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J. Infect. Dev. Ctries.* **3**, 342–351 (2009)
20. Gattermann S., Kreft B., Marre R., Wanner G.: Identification and characterization of a surface-associated protein (Ssp) of *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect. Immune.* **60**, 1055–1060 (1992)
21. Geoghegan J. A., Corrigan R. M., Gruszka D. T., Speziale P., O’Gara J. P., Pots J. R., Foster T. J.: Role of Surface Protein SasG in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **192**, 5663–5673 (2010)
22. Geoghegan J.A., Monk I.R., O’Gara J.P., Foster T.J.: Subdomains N2N3 of Fibronectin Binding Protein A Mediate *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Adherence to Fibrinogen Using Distinct Mechanisms. *J. Bacteriol.* **195**, 2675–2683 (2013)
23. Gospodarek E., Szopiński J., Mikucka A.: Zakażenia miejsca operowanego – postaci kliniczne, czynniki ryzyka, profilaktyka, etiologia, diagnostyka. *Forum Zakażeń*, **4**, 275–282 (2013)
24. Górecki A., Babiak I.: Leczenie zakażeń w obrębie narządu ruchu. Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń, red. W. Hryniewicz, J. Meszaros, PZWŁ, Warszawa 2001, s. 732–770
25. Górecki A., Marczyński W., Babiak I.: Zasady profilaktyki, rozpoznawania i leczenia nieswoistych zakażeń kości i stawów. *Ortop. Traumatol. Rehab.* **4**, 396–415 (2008)
26. Holmberg A., Lood R., Mörgelin M., Söderquist B., Holst E., Collin M., Christensson B., Rasmussen M.: Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 787–795 (2009)
27. Hryniewicz W., Małydyk P., Ozorowski T., Babiak I., Krogulec Z.: Profilaktyka, diagnostyka i terapia zakażeń w ortopedii. Narodowy Instytut Leków, Warszawa, 2013, s. 16–25
28. Jämsen E., Nevalainen P., Eskelinen A., Huotari K., Kalliovalkama J., Moilanen T.: Obesity, diabetes, and preoperative hyperglycemia as predictors of periprosthetic joint infection: a single-center analysis of 7181 primary hip and knee replacements for osteoarthritis. *J. Bone. Joint. Surg. Am.* **94**, 1–9 (2012)
29. Kaczała M., Gmyrek J., Mnichowska-Polanowska M., Giedrys-Kalemba S.: Patomechanizm zakażenia *Candida* w stomatopatiach protetycznych. *Czas. Stomat.* **61**, 886–893 (2008)
30. Klimaszewska K.: Zastosowanie biomateriałów w medycynie na przykładzie endoprotezy stawu biodrowego. Wybrane zagadnienia z inżynierii materiałowej. Politechnika Lubelska, Lublin, 2013, s. 91–104
31. Kołodyński J., Jankowski S.: Systemy międzykomórkowej sygnalizacji u bakterii. *Adv. Clin. Exp. Med.* **14**, 343–348 (2005)
32. Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochrona Środowiska*, **33**, 3–14 (2011)
33. Kuthan R.T., Łuczak M., Młynarczyk G.: Wytwarzanie biofilmu przez metycyliny-oporne szczepy *Staphylococcus aureus*. *Post. Nauk. Med.* **10**, 862–868 (2011)
34. Lübbecke A., Rothman K.J., Garavaglia G., Barea C., Christofilopoulos P., Stern R., Hoffmeyer P.: Strong association between smoking and the risk of revision in a cohort study of patients with metal-on-metal total hip arthroplasty. *J. Orthop. Res.* **32**, 762–768 (2014)
35. Majda A., Walas K., Gawełek A.: Jakość życia pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów biodrowych. *Probl. Piel.* **21**, 29–37 (2013)
36. McCormack N., Foster T.J., Geoghegan J.A.: A short sequence within subdomain N1 of region A of the *Staphylococcus aureus*

- MSCRAMM clumping factor A is required for export and surface display. *Microbiology*, **160**, 659–670 (2014)
37. Meyer U., Büchter A., Wiesmann H.P., Joos U., Jones D.B.: Basic reactions on osteoblasts on structured material surfaces. *Eur. Cell Mater.* **9**, 39–49 (2005)
 38. Montewka M., Skrzek A., Plewik D., Rudzki S., Wysokiński A., Koziół-Montewka M.: Zakażenia miejsca operowanego – charakterystyka czynników ryzyka, endogennych źródeł zakażenia i metody zapobieganie. *Post. Mikrobiol.* **51**, 227–235 (2012)
 39. Muszyński Z.: Drobnoustroje skóry człowieka – wskazówki dla kosmetologów. *Homines Hominibus*, **6**, 55–64 (2010)
 40. Näsell H., Ottosson C., Törnqvist H., Lindé J., Ponzer S.: The impact of smoking on complications after operatively treated ankle fractures- a follow-up study of 906 patients. *J. Orthop. Trauma*. **25**, 748–755 (2011)
 41. Nowacki J., Dobrzański L.A., Gustavo F.: Implanty śródstypkowe w osteosyn-tezie kości długich. Open Access Library. International OCSCO World Press, Gliwice, 2012, s. 52
 42. Nowak A., Tyski S.: Dwuskładnikowe systemy regulacyjne zia-renkowców Gram-dodatnich i ich rola w tworzeniu biofilmu. *Post. Mikrobiol.* **51**, 265–276 (2012)
 43. Nowicka J., Bartoszewicz M., Rygiel A.: Czynniki wirulencji i chorobotwórczość gronkowców koagulazo-ujemnych. *Forum Zakażeń*, **3**, 83–89 (2012)
 44. Nuryastuti T., Krom B.P., Aman A.T., Busscher H.J., van der Mei H.C.: Ica-expression and gentamicin susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on orthopedic implant biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. A*. **96**, 365–371 (2011)
 45. Odom-Forren J.: Preventing surgical site infections. *Nursing*, **36**, 58–63 (2006)
 46. Paszkiewicz-Mes E.: Palenie tytoniu w aspekcie powikłań występujących po za biegu operacyjnym. *Probl. Hig. Epidemiol.* **93**, 249–255 (2012)
 47. Pathak A.K., Sharma S., Shrivastva P.: Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. *J. Appl. Oral Sci.* **20**, 70–75 (2012)
 48. Pedersen A.B., Svendsen J.E., Johnsen S.P., Riis A., Overgaard S.: Risk factor for revision due to infection after primary total hip arthroplasty. *Acta Orthop.* **81**, 542–547 (2010)
 49. Piette A., Verschraegen G.: Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet. Microbiol.* **134**, 45–54 (2009)
 50. Qin Z., Yang X., Yang L., Jiang J., Ou Y., Molin S., Qu D.: Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* **56**, 83–93 (2007)
 51. Ramage G., Saville S.P., Thomas D.P., Lopez-Ribot J.L.: *Candida albicans*: an update. *Eukaryot. Cell*. **4**: 633–638 (2005)
 52. Ramage G., Tunney M.M., Patrick S., Gorman S.P., Nixon J.R.: Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. *Biomaterials*, **24**, 3221–3227 (2003)
 53. Reiter K.C., Sant'Anna F.H., d'Azevedo P.A.: Upregulation of icaA, atlE and aap genes by linezolid but not vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **43**, 248–253 (2014)
 54. Ribeiro M., Monteiro F.J., Ferraz M.P.: Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomater.* **2**, 176–194 (2012)
 55. Sadowska B., Różalska B.: Gronkowce – na co jeszcze je stać? *Post. Mikrobiol.* **49**, 173–178 (2010)
 56. Schommer N.N., Christner M., Hentschke M., Ruckdeschel K., Aepfelbacher M., Rohde H.: *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect. Immun.* **79**, 2267–2276 (2011)
 57. Scolaro J.A., Schenker M.L., Yannascoli S., Baldwin K., Menta S., Ahn J.: Cigarette smoking increases complications following fracture: a systemic review. *J. Bone Joint. Surg. Am.* **96**, 674–681 (2014)
 58. Sellman B.R., Timofeveya Y., Nanra J., Scott A., Fulginiti J.P., Matsuka Y.V., Baker S.M.: Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG increases following exposure to an *in vivo* environment. *Infect. Immun.* **76**, 2950–2957 (2008)
 59. Sikora A., Koziół-Montewka M.: Zakażenia miejsca operowanego: aspekty kliniczne i mikrobiologiczne. *Wiad. Lek.* **63**, 221–229 (2010)
 60. Skowronek M., Dutka J.: Endoprotezoplastyka stawów u pacjentów przewlekle dializowanych. Kwalifikacja, czynniki ryzyka i korzyści. *Przegl. Lek.* **69**, 667–669 (2012)
 61. Slane J., Vivanco J., Rose W., Ploeg H.L., Squire M.: Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **48**, 188–196 (2015)
 62. Solati S.M., Tajbakhsh E., Khamesipour F., Gugnani H.C.: Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. *AMB. Expr.* **5**, 2–5 (2015)
 63. Strzelec-Nowak D., Bogut A., Niedźwiadek J., Koziół-Montewka M., Sikora A.: Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń implantów stawu biodrowego. *Post. Mikrobiol.* **51**, 219–225 (2012)
 64. Szczepny G., Babiak I., Kowalewski M., Górecki A.: Septyczne oblu-zowanie protez stawów biodrowego i kolanowego. *Chir. Narządów Ruchu Ortop. Pol.* **70**, 179–184 (2005)
 65. Szczypa K., Wilemska J., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Mechanizmy wirulencji *Streptococcus pyogenes*. *Post. Mikrobiol.* **51**, 3–15 (2012)
 66. Szewczyk E.M., Dudkiewicz B., Kwaszewska A., Lisiecki P., Różalska M., Sobiś-Glinkowska, Szarapińska-Kwaszewska J., Szemraj J., Szemraj M., Wysocki P.: Diagnostyka bakteriologiczna. red. E. M. Szewczyk, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2013
 67. Świeczko-Żurek B., Zieliński A., Ossowska A., Sobieszczyk A.: Biomateriały. Politechnika Gdańska, Gdańska, 2011, s. 4–13
 68. Uzunoglu E., Bicer A.Z.Y., Dolapci I., Dogan A.: Biofilm-forming ability and adherence to poly-(methyl-methacrylate) acrylic resin materials of oral *Candida albicans* strains isolated from HIV positive subjects. *J. Adv. Prosthodont.* **6**, 30–34 (2014)
 69. Widuchowski J., Kusz D., Pierzchała A., Widuchowski W.: Alloplastyka całkowita stawu kolanowego. *Wiad. Lek.* **57**, 166–170 (2004)
 70. Williams D.F.: Definitions in biomaterials. Amsterdam-Oxford-New-York-Tokyo, Elsevier, 1987
 71. Wróbel E., Witkowska-Zimny M., Przybylski J.: Biologiczne mechanizmy procesu osteointegracji. *Ortop. Traumatol. Rehabil.* **12**, 401–409 (2010)
 72. Wróbel M., Zdrojowy R., Dembowski J., Kołodziej A., Małkiewicz B., Musioł D., Wróbel E.: Zapobieganie zakażeniom u chorych leczonych operacyjnie. *Prz. Urol.* **43**, 57–62 (2007)
 73. Wróblewska J., Ciok-Pater E., Sękowska A., Gospodarek E.: Porównanie trzech metod oceny wytwarzania śluzu przez *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **62**, 303–308 (2010)
 74. Zdzlik D., Dominiak A., Gałkowska H., Interewicz B., Olszewski W.L., Stelmach E., Łuczak M., Machowski Z.: Charakterystyka molekularna szczepów *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* wyizolowanych z materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **58**, 269–274 (2006)

1. Wprowadzenie. 2. Arbuskularne grzyby mykoryzowe. 3. Budowa i właściwości glomaliny. 4. Produkcja i rozkład glomaliny. 5. Występowanie glomaliny. 6. Terminologia i metodyka oznaczeń. 7. Funkcje glomaliny. 8. Czynniki wpływające na spadek produkcji glomaliny. 9. Podsumowanie

Glomalin – soil glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungus

Abstract: Glomalin is hydrophobic glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). AMF can excrete glomalin into the soil. Glomalin is an abundant soil protein that could sequester substantial amounts of carbon and sodium on a global scale. It has a positive influence on soil structure by increasing aggregate stability of soil, which correlates linearly with the amount of detected glomalin. Glomalin production has an impact on many environmental factors including soil condition. Its content in soil is dependent on both the types of plants and fungal symbiotic species. Glomalins are especially resistant to destruction and hard to dissolve in water. Their extraction from the soil requires specific conditions: high temperature (121°C) and citrate buffer with neutral or alkaline pH. These properties make glomalins very stable compounds that create a perfect protective “jacket” for soil aggregates against degradation. However, they are also difficult to understand and determining their exact construction is still a challenge.

1. Introduction. 2. Arbuscular mycorrhizal fungus. 3. Structure and properties of glomalin. 4. Production and decomposition of glomalin. 5. Origins of glomalin. 6. Terminology and methods. 7. Role of glomalin. 8. Factors affecting glomalin production. 9. Summary

Słowa kluczowe: arbuskularne grzyby mykoryzowe, gleba, glikoproteina, glomalina

Key words: arbuscular mycorrhizal fungus, soil, glycoprotein, glomalin

1. Wprowadzenie

Jednym z podstawowych i charakterystycznych składników gleby jest substancja organiczna [38, 58]. W jej skład wchodzi wszystkie obumarłe szczątki roślinne, zwierzęce, szczątki licznych drobnoustrojów oraz grzybów, jak również organiczne produkty ich rozkładu nagromadzone w różnej postaci w glebie i na jej powierzchni. Martwa substancja organiczna i produkty jej biochemicznych przemian decydują o korzystnym układzie całego kompleksu właściwości gleby, od których z kolei zależy jej żyzność i produktywność [29, 55]. Substancja organiczna odgrywa główną rolę w tworzeniu gruzełkowatej struktury gleby, ma bardzo duży wpływ na infiltrację wody, rozwój korzeni i odporność na erozję [37]. Materia ta jest także magazynem składników pokarmowych i warunkuje pojemność absorpcyjną dla kationów [37, 48]. Organizmy żywe (edafon) na ogół nie są zaliczane do substancji organicznej gleby, chociaż w warstwach ornych to właśnie edafon a w nim głównie mikroorganizmy oraz części podziemne roślin stanowią 10–15% całkowitej ogólnej masy materii organicznej gleby [5, 28, 58].

W środowisku glebowym najaktywniejszą biologicznie warstwą, ściśle powiązaną z życiem mikrobiologicznym i roślinami jest ryzosfera [21, 40]. Ryzosfera to przykorzeniowa warstwa gleby bezpośrednio przy-

legająca do korzeni roślin, obszar intensywnej aktywności biologicznej, cechujący się bogatą florą bakteryjną i grzybową, mający duży wpływ na pobieranie przez korzenie substancji pokarmowych [25]. Jest to gleba przesycona wydzielinami systemu korzeniowego i produktami zasiedlających ją drobnoustrojów, które wykorzystują wydzieliny korzeniowe jako źródło węgla, azotu i energii. W ryzosferze występują różnice w składzie jakościowym mikroorganizmów w zależności od gatunku rośliny oraz w składzie ilościowym, zależnie od stadium rozwojowego rośliny [21]. W ryzosferze licznie zachodzą dynamiczne (zarówno pozytywne jak i negatywne) interakcje pomiędzy mikroorganizmami oraz mikroorganizmami i rośliną [2, 21, 23, 35, 40].

Od wielu lat oddziaływanie pomiędzy glebą a korzeniami roślin i wpływ roślin na skład i cechy gleby są przedmiotem badań [2, 27, 35, 74, 75]. Jednym z najważniejszych przykładów symbiozy jest związek pomiędzy roślinami i grzybami mykoryzy arbuskularnej (*arbuscular mycorrhizal fungi* AMF) [27, 39, 42]. Grzyby mykoryzowe towarzyszą roślinom w ewolucji od czasów opanowania przez nie środowiska lądowego. Wspomagają adaptację roślin do nowych warunków: deficytu wody, przyswajanie składników pokarmowych, zmian temperatury, promieniowania UV i innych czynników potencjalnie stresogennych dla roślin [7, 10, 20, 27, 33, 42].

* Autor korespondencyjny: Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel. 081 8863421; e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl

Badania mykoryz zaowocowały niedawno odkryciem glomaliny – glikoproteiny produkowanej przez grzyby mykoryzy arbuskularnej głównie z rodzaju *Glomus* [74, 75]. Pomimo szerokiej wiedzy na temat korzystnego oddziaływania grzybów mykoryzowych na wzrost i rozwój roślin nadal stosunkowo niewiele wiadomo o dodatkowej roli środowiskowej tych grzybów, związanej z wytwarzaniem glomaliny i jej obecności w glebie. W naszym kraju nie prowadzono dotychczas szczegółowych badań nad tą substancją. Niniejsza publikacja jest próbą podsumowania dotychczasowej wiedzy na temat glomaliny, jej budowy, funkcji oraz występowania.

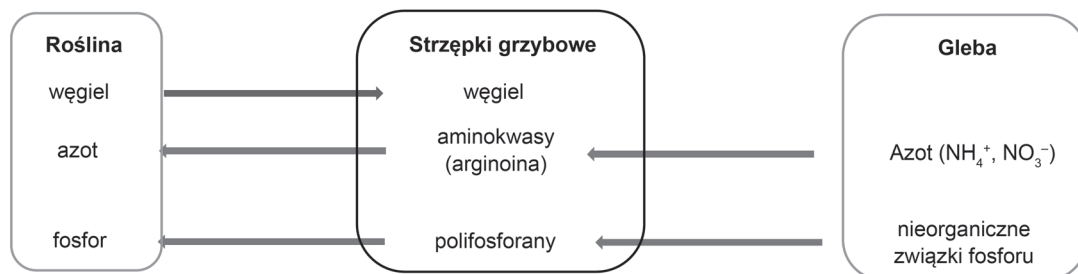
2. Arbuskularne grzyby mykoryzowe (AMF)

Powszechnie występującymi grzybami glebowymi, o kluczowym znaczeniu dla roślin, są arbuskularne grzyby mykoryzowe [17, 24, 27]. Symbioza grzybów AMF z roślinami jest prawdopodobnie najstarszym i najpowszechniej występującym na świecie związkiem pomiędzy grzybem a rośliną [33, 42]. Zewnętrzne struktury grzybów AMF to penetrujące glebę strzępki i pojedyncze spory spoczynkowe. Spory wytwarzane są bezpłciowo ze strzępek grzybowych, które służą rozmnażaniu i przetrwaniu tych grzybów w glebie. Symbiozę tę nazywa się symbiozą arbuskularną (AM), ponieważ jedyną strukturą obecną w komórkach miękkich korzeni roślin są arbuskule, tj. rozgałęzione końce strzępek, które biorą udział w dwustronnej wymianie węgla, fosforu i innych fizjologicznie znaczących cząstek [17, 35, 42, 53]. Symbioza AM jest powszechna w glebach o pH bliskim naturalnego, zawierających przyswajalny azot mineralny. Fosfor jest często składnikiem występującym w tych warunkach w ograniczonej ilości [52]. Wymiana składników pokarmowych zachodzi pomiędzy rozgałęzionymi

strzępkami grzybni a błoną komórkową rośliny, która nie ulega rozerwaniu (Rys. 1) [20, 33, 35, 52, 54].

Endomykoryza dominuje wśród roślin zielonych (co najmniej u 70–80% roślin na kuli ziemskiej), a stopień zasiedlenia korzeni rośliny przez grzyby mykoryzowe i ich aktywność podlega zmianom podczas sezonu wegetacyjnego [27]. Symbioza ta jest tworzona z wieloma trawami, niemal ze wszystkimi roślinami użytkowanymi rolniczo, w tym także z roślinami bobowatymi oraz niektórymi drzewami i krzewami [17]. Stopień zasiedlenia korzeni zwiększa się do fazy dojrzałości rośliny, jest często równocześnie sygnałem do zwiększonego wytwarzania spor przez strzępki pozakorzeniowe. Grzyby endomykoryzowe charakteryzują się zasiedleniem tkanki korzeniowej rośliny zarówno w przestrzeni międzykomórkowych jak i we wnętrzu komórek. Kolonizacja wnętrza korzeni przez strzępki grzybów endomykoryzowych powoduje zmiany zarówno morfologiczne jak i fizjologiczne u obu symbiontów, w tym zmianę składu i ilości wydzielin korzeniowych oraz produkcję glomaliny [33, 47, 75].

Grzyby AMF zostały zaklasyfikowane do gromady *Glomeromycota* (Tabela I) [7]. Gromada ta obejmuje jedną klasę *Glomeromycetes*, cztery rzędy (*Archaeosporales*, *Diversisporales*, *Glomerales*, *Paraglomerales*), 10 rodzin (*Acaulosporaceae*, *Ambisporaceae*, *Archaeosporaceae*, *Diversisporaceae*, *Entrophosporaceae*, *Geosiphonaceae*, *Gigasporaceae*, *Glomeraceae*, *Pacisporaceae*, *Paraglomeraceae*) i 15 rodzajów (*Acaulospora*, *Ambispora*, *Archaeospora*, *Diversispora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Intraspora*, *Geosiphon*, *Otospora*, *Pacispora*, *Paraglomus*, *Racocetra*, *Scutellospora*, *Umbospora*), które wyodrębniono w oparciu o budowę zarodników, morfologię grzyba oraz analizy genetyczne, głównie na podstawie filogenetycznej analizy sekwencji genu SSU rRNA [57]. Poznana jest dokładna filogeneza oraz taksonomia *Glomeromycota* wraz z bazą ok. 230 gatunków AMF [56]. Za produkcję glomaliny odpowiedzialne są



Istotą symbiozy AM jest wpływ na:

- odżywianie, udostępnianie i pobieranie fosforu, azotu, mikroelementów oraz przemieszczanie asymilatów,
- ochronę przed stresami abiotycznymi (susza, zasolenie, pH i temperatura) oraz stresem biotycznym (patogenami glebowymi, nicieniami, infekcje liściowe).
- procesy fizjologiczne (fotosynteza, gospodarka wodna, wymiana gazowa).
- procesy biochemiczne (aktywność enzymatyczną).
- poprawę struktury gleby (agregaty wodoodporne, produkcja glomaliny).

Rys. 1. Korzyści wynikające z symbiozy roślin z grzybami AMF

Tabela I
Klasyfikacja arbuskularnych grzybów mykoryzowych [7, 57]

Systematyka				
Gromada	<i>Glomeromycota</i> C. Walker & Schuessler			
Klasa	<i>Glomeromycetes</i> Cavalier- Smith			
Rząd	<i>Glomerales</i> J.B. Morton & Benny	<i>Paraglomerales</i> Walker & Schuessler	<i>Archaeosporales</i> C. Walker & Schuessler	<i>Diversisporales</i> C. Walker & Schuessler
Rodzina	<i>Glomeraceae</i> Piroz. & Dalpé	<i>Paraglomaceae</i> J.B. Morton & D. Redecker	<i>1. Ambisporaceae</i> C. Walker, Vestberg & Schuessler <i>2. Archaeosporaceae</i> J.B. Morton & D. Redecker emend. Oehl & Sieverd <i>3. Geosiphonaceae</i> Engler. & E. Gilg emend. Schuessler	<i>1. Acaulosporaceae</i> J.B. Morton & Benny <i>2. Diversisporaceae</i> C. Walker & Schuessler <i>3. Entrophosporaceae</i> Oehl & Sieverd. <i>4. Gigasporaceae</i> J.B. Morton & Benny <i>5. Pacisporaceae</i> C. Walker, Blaszk., Schuessler & Scharzott
Rodzaj	<i>Glomus</i> Tul. & C. Tul.	<i>Paraglomus</i> J.B. Morton & D. Redecker.	<i>1a. Ambispora</i> Spain, Oehl & Sieverd. <i>1b. Archaeospora</i> J.B. Morton & D. Redecker <i>2. Intraspora</i> Oehl & Sieverd. <i>3. Geosiphon</i> (Kütz.) F. Wettst.	<i>1a. Acaulospora</i> Gerd. & Trappe emend. S.M. Berch <i>1b. Kuklospora</i> Oehl & Sieverd. <i>1c. Acaulospora</i> Gerd. & Trappe emend. S.M. Berch <i>2a. Diversispora</i> C. Walker & Schuessler <i>2.b. Otospora</i> Oehl, J. Palenzuela & N. Ferrol <i>3. Entrophospora</i> R.N. Ames & E.W. Schneid. Emend. Oehl & Sieverd <i>4a. Gigaspora Gerd.</i> & Trappe emend. C. Walker & F.F. Sanders <i>4b. Scutellospora</i> C. Walker, Blaszk., Schuessler & Schwarzott <i>5. Pacispora</i> Oehl & Sieverd.
Grupy	<i>Glomus</i> – A <i>Glomus</i> – B			
Niektóre gatunki z rodzaju <i>Glomus</i> produkujące glomaliny: – <i>Glomus mosseae</i> – <i>Glomus etunicatum</i> – <i>Glomus fasciculatum</i> – <i>Glomus caledonium</i> – <i>Glomus clarum</i> – <i>Glomus intraradices</i> – <i>Glomus macrocarpus</i>				

głównie grzyby z rodzaju *Glomus* [7, 57]. U pozostałych przedstawicieli gromady *Glomeromycota* nie stwierdzono zdolności wytwarzania glomaliny za wyjątkiem niewielkich ilości glomaliny produkowanych przez rodzaj *Gigaspora* i *Acaulospora* [31].

Rodzaj *Glomus* obejmuje kilkadziesiąt gatunków, ponadto w obrębie tego rodzaju wyodrębniono dwie grupy, nie mające statusu taksonomicznego – *Glomus*-A i *Glomus*-B [7]. Grupa *Glomus*-A skupia gatunki,

których ściana zarodników nie posiada wewnętrznej, giętkiej warstwy. Grupę tę reprezentują m.in. *Gl. caledonium*, *Gl. coronatum* Giovannetti i *Gl. verruculosum* [7]. Głównymi gatunkami tworzącymi grupę *Glomus*-B są *Gl. claroideum* i *Gl. lamellosum*. Wspólną cechą tych grzybów jest wewnętrzna, giętka warstwa ściany ich zarodników, która u drugiego gatunku barwi się różowo do czerwonego w odczynniku Melzera [7, 57]. Do najczęściej spotykanych gatunków grzybów

z rodzaju *Glomus* produkujących glomaliny zaliczamy: *Glomus mosseae* (zakażający m.in. bób, bobik *Vicia faba* i pory *Allium porrum*) i *Glomus fasciculatum* znany jako partner (soi *Glycine max*) (Tabela I).

3. Budowa i właściwości glomalin

Już w latach 90-tych XX wieku prowadzono badania nad obecnością i udziałem węglowodanów w tworzeniu agregatów glebowych oraz wykazano pozytywne korelacje pomiędzy trwałością agregatów glebowych a ilością węglowodanów ekstrahowanych z gleby [47]. Analiza chemiczna frakcji organicznej wykazała, że znajdująca się w mikroagregatach substancja organiczna jest głównie pochodzenia mikrobiologicznego, zaś w agregatach glebowych jest większa zawartość składników pokarmowych niż w glebie poza nimi [38, 48]. Badania te stały się podstawą do dalszych analiz zawartości C, H i N w agregatach glebowych, co przyczyniło się do odkrycia glomalin [74, 75].

Glomaliny to bardzo charakterystyczne pod względem budowy i właściwościach fizykochemicznych białka grzybowe [12, 74, 75]. Są to stabilne cząsteczki białkowe, nierozpuszczalne w wodzie i odporne na degradację stabilizujące agregaty glebowe i chroniące je przed roz biciem [37]. Pomimo wielu lat badań do tej pory nie udało się dokładnie określić budowy glomaliny. Biorąc pod uwagę dotychczasowe wyniki badań wiadomo, że jest to silnie hydrofobowa glikoproteina z łańcuchem oligosacharydowym na N-końcu [72, 74, 77]. To właśnie hydrofobowe domeny molekuly są odpowiedzialne za trudności w ich ekstrakcji i małą rozpuszczalność. Wiadomo, iż pod względem biochemicznym glomalina składa się z podjednostki białkowej i cukrowej, a główne pierwiastki wchodzące w skład jej budowy to: azot, węgiel, wodór, tlen, fosfor i żelazo (Tabela II) [72]. Zmienny skład pierwiastkowy w składzie budowy glomaliny zależy przede wszystkim od gatunku grzyba produkującego białko oraz warunków środowiskowych. Żelazo obecne w składzie glomaliny po pierwsze nadaje brunatno-czerwony odcień ekstraktowi białka, a po drugie jest odpowiedzialne za odporność roślin na stres i patogeny [68, 72].

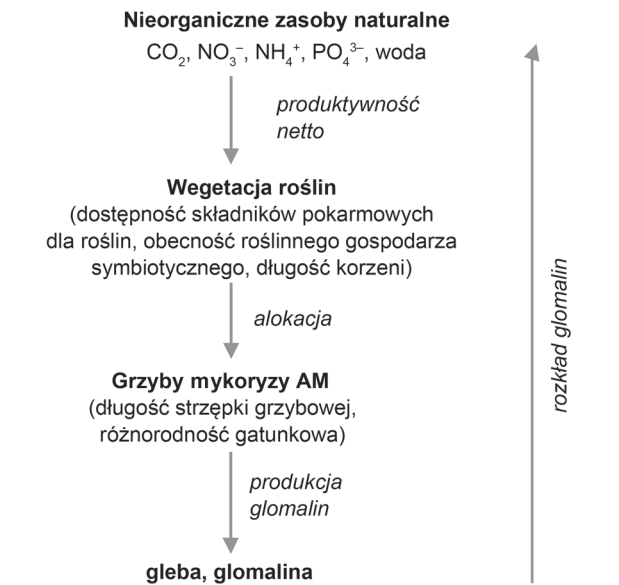
Tabela II
Skład pierwiastkowy glomaliny

Pierwiastek	Udział procentowy [%]
azot	od 1% do 5%
węgiel	od 36% do 59%
wodór	od 4% do 6%
tlen	od 33% do 49%
fosfor	od 0,03% do 0,1%
żelazo	od 0,8% do 8,8% Fe

Wyniki szeregu technik pomiarowych wykazały odmienną budowę strukturalną glomalin niż kwasu huminowego czy fulwowego oraz inny rozkład podjednostek białkowych i cukrowych w porównaniu do znanych już molekuł stanowiących glebową frakcję organiczną [48, 56]. Ponadto zespół naukowy pod kierunkiem Sary Wright wykazał, że waga glomalin jest od 2–24 razy większa niż kwasu huminowego, przy czym wiadomo, że kwas ten stanowi zaledwie 8% zawartości węgla w glebie [71, 74]. Z jednej strony takie właściwości powodują, że glomaliny są bardzo stabilnymi związkami będącymi idealnym płaszczem do ochrony agregatów glebowych przed degradacją, z drugiej zaś strony stwarzają duże trudności w poznaniu i ustaleniu dokładnej budowy tych cząsteczek.

4. Produkcja i rozkład glomalin

Produkcja i magazynowanie glomaliny następuje w strzępkach grzybów endomycoryzowych (Rys. 2) [10, 74, 75]. Strzępki mogą rosnąć nawet kilkanaście centymetrów ponad korzeniami uzyskując w ten sposób większy dostęp do substancji odżywczych zawartych w glebie. Analizy przy użyciu ilościowych metod immunoenzymatycznych m.in. metodą ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) i przeciwciał monoklonalnych wykazały dokładną lokalizację glomaliny we wnętrzu grzybni, dzięki czemu możliwe stało się wyjaśnienie sposobu rozmieszczenia i transportu tegoż białka do gleby [68].



Rys. 2. Produkcja i rozkład glomalin w glebie

Początkowe badania Wright i Upadhyaya [68] przy użyciu technik immunofluorescencyjnych wykazały, że glomalina zlokalizowana jest głównie na powierzchni strzępek i spor grzybów AMF, i jako hydrofobowa war-

stwa okrywa grzybnię i chroni ją przed jej degradacją przez inne mikroorganizmy, a także zwiększa sztywność i trwałość ścian komórkowych ułatwiając rozprzestrzenianie się strzępek w glebie [75]. Uważano wówczas, iż glomaliny są białkowymi wydzielinami tylko żywych strzępek grzybowych [75], a „złuszczająca się” ze strzępek glomalina zostaje na korzeniach, okrywa resztki organiczne i cząstki glebowe, łącząc je ze sobą i tym samym utrzymując trwałość agregatów glebowych. Wright i Upadhyaya [74] zakładali, iż glomaliny na zasadzie transportu wymiennego, w momencie pobierania wody i składników odżywczych przez strzępki grzybowe, zostają „wyrzucone” na zewnątrz grzybni. Uważa się, iż podobnie jak translokacja fosforu wewnątrz grzybów AMF również i przemieszczanie się glomaliny w obrębie strzępki odbywa się poprzez ruch cytoplazmy [48, 49, 52].

Dopiero badania Driver i wsp. [11] podważyły tę hipotezę. Udowodniono bowiem, iż glomaliny są produkowane i magazynowane nie tylko podczas intensywnego wzrostu strzępki, ale również są przekazywane do gleby po obumarciu grzyba na skutek rozkładu grzybni (Rys. 2). Według tej teorii żywe strzępki grzyba nie wydzielają dużej ilości glomaliny do gleby, dopiero po rozkładzie grzybni większość zasobów glomaliny jest uwalniana do gleby [11, 62]. W miarę starzenia się strzępek pozakorzeniowych oraz korzeni roślin, biomasa grzybni ulega degradacji podczas gdy glomalina nie ulega rozkładowi. Większość jej, na ogół w niezmiennionej formie, pozostaje w glebie [46]. Ilość obecnych w glebie glomalin nie jest jednak równoznaczna z produkcją tej substancji przez grzyba i jego późniejszym rozkładem ale w dużej mierze wiąże się ze środowiskiem w jakim następuje mykoryza [43]. Warunki środowiskowe mają decydujący wpływ na efektywność symbiozy grzyba z rośliną a tym samym na produkcję glomaliny. Według Rilliga i Mummey’a [42] produkcja i rozkład glomaliny w środowisku glebowym wiąże się z wieloma czynnikami zarówno odnoszącymi się do fizyko-chemicznych właściwości gleby, jak i rośliny oraz gatunku grzyba tworzącego symbiozę AM. Struktura gleby i jej właściwości chemiczne mają istotny wpływ na wzrost grzybni, a tym samym na zawartość glomaliny w strzępkach grzybowych [46].

Według Rilliga i Steinberga [46] ilość glomalin obecnych w glebie może stanowić aż 5% węgla organicznego w glebie i azotu. Mimo, iż glomalina może stanowić istotny rezerwuar C i N w glebie to jednak mechanizm i ekofizjologiczne funkcje tego procesu nie są dokładnie poznane. Również tempo produkcji glomaliny przez grzyby AMF nie jest dokładnie określone. Wright i Upadhyaya [71] wykazały, iż w kontrolowanych warunkach podczas 14 tygodni wzrostu roślin tworzących symbiozę z określonym gatunkiem grzyba AMF produkcja glomaliny w zależności

od gatunku grzyba wahała się od 100 do 168 mg EE-IRSP m⁻² foli ogrodniczej.

Rillig i wsp. zakładali, iż ilość wytworzonej glomaliny powinna korelować liniowo z długością strzępek korzeniowych [44], bowiem dobrze rozwinięty system korzeniowy rośliny zapewnia większą dostępność do składników pokarmowych m.in. CO₂, NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻ i wody. Z kolei Nichols i Wright [36] zakładali, iż największy wpływ na produkcję glomalin mają biologiczne właściwości gleby (głównie aktywność mikrobiologiczna gleby) oraz właściwości fizykochemiczne tj. struktura gleby, zawartość substancji ilastych (zapewniających fizyczną ochronę). Glomaliny obecne w glebie okrywają strzępki grzybni utrzymując wodę i składniki odżywcze przed utratą w drodze do i z rośliny [71]. Według Nichols i Wright [36] ilość węgla organicznego obecnego w strzępkach grzybowych stanowi od 5 do 90 C g m⁻². Natomiast Lovelock i inni [31] ocenili, iż zawartość glomaliny w tej biomase stanowi niewielki odsetek (0,4–6%).

Istnieje wiele badań dotyczące korelacji pomiędzy zawartością glomaliny w glebie a długością strzępek grzybowych [31, 36, 44]. Badania te nie wykazały jednoznacznie związku pomiędzy stężeniem tegoż białka w glebie a długością strzępki.

Badania Lovelock i wsp. [31] dotyczące oszacowania wydajności produkcji glomalin przez grzyby AMF prowadzone były w warunkach kontrolowanych na inkubowanych glebach lasów tropikalnych w Kostaryce oraz na piaszczystych glebach pod uprawą kukurydzy w Maryland USA. Produkcja łatwoekstrahowalnego immunoaktywnego białka glebowego EE-IRSP (*easily extractable immunoreactive soil protein*) po zaszczepieniu grzybnią mykoryzowa gleb w lasach deszczowych Kostaryki wahała się od 3,6 do 16,7 g EE-IRSP kg⁻¹ strzępki podczas 4 tygodniowej inkubacji, natomiast na glebie pod uprawą kukurydzy od 1,2 do 6,5 g EE-IRSP kg⁻¹ strzępki [31].

Lovelock i wsp. [31] wykazali, iż ilość białka EE-IRSP nie jest skorelowana z długością grzybni AMF. Wraz z przyrostem strzępki grzybowej wydajność produkcji glomaliny (w mikrogramach glomalin na metr strzępek) w zależności od gatunku grzyba istotnie zmniejszyła się. Produkcję znaczących ilości glomalin stwierdzono głównie u gatunków z rodzaju *Glomus* [75]. W badaniach Wright i Upadhyaya [71] dotyczących monokultury grzybów hodowanych w warunkach laboratoryjnych *Gigaspora rosea* i *Gigaspora gigantea* wykazano większą produkcję białka EE-IRSP w porównaniu do *Glomus intraradices* i *Glomus etunicatum*. Gatunki *Gigaspora rosea* i *Glomus caldonium* produkowały od 30 do 43% więcej EE-IRSP niż w przypadku *Glomus intraradices* [71]. W doświadczeniach polowych wyższe stężenia glomalin stwierdzano dla gatunków *Glomus* [67, 71].

W badaniach Lovelock i wsp. [31] również w kontrolowanych warunkach wzrostu grzybni dla gatunku *Acaulospora morrowiae* uzyskano stosunkowo wysokie stężenia białka EE-IRSP ($0,036 \mu\text{g m}^{-1}$ strzępki) w porównaniu z gatunkami *Gigaspora rosea*, *Glomus etunicatum*, i *Glomus intraradices* ($0,026$, $0,022$ i $0,0068 \mu\text{g m}^{-1}$ strzępki, odpowiednio). Analogiczny schemat doświadczenia przeniesiony do warunków polowych wykazywał większą produkcję glomaliny dla gatunku *Glomus* [1, 4, 31].

Za brak korelacji pomiędzy długością strzępki AMF i stężeniem glomaliny produkowanej przez dany gatunek może być odpowiedzialny szereg mechanizmów biotycznych i abiotycznych. Dla przykładu, średnica strzępki grzybowej może zmieniać się między próbkami, więc odcinki grzybni o różnej grubości nie stanowią dobrego wskaźnika produkcji glomaliny [31]. Również czas degradacji strzępki grzybowej i uwolnienia glomaliny do gleby jest zależny od gatunku grzyba [43, 44, 49, 51]. Czas rozkładu glomaliny szczególnie w środowisku naturalnym nie jest dobrze udokumentowany. Z doświadczeń laboratoryjnych wynika, iż czas rozkładu białka waha się w zależności od warunków środowiska i gatunku grzyba od kilku dni do kilku miesięcy [49, 51].

Rilling i wsp. [48] wykazali stosując węgiel aktywny ^{14}C , że okres całkowitego rozkładu glomaliny w glebach może wynosić nawet kilkanaście lat, a podatność na rozkład tych cząsteczek związanych z minerałami glebowymi lub z humusem może być jeszcze mniejsza.

Glomaliny ekstrahowane z gleby są bardzo podobne do glomaliny ekstrahowanych z pojedynczych kultur grzybowych pochodzących z doświadczeń laboratoryjnych. Badania te prowadzono w oparciu o metody: elektroforezy żelowej białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) [66, 67], spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego NMR (*nuclear magnetic resonance*) [48] elektroforezy kapilarnej [72] oraz analizy C, H, N [13, 48]. Istnieją zaledwie niewielkie różnice pomiędzy próbkami glomaliny ekstrahowanych z gleby i z kultur grzybowych *in vitro* [13]. Różnice te nie wynikają z budowy samej cząsteczki glomaliny ale jedynie z zawartości procentowej jej pojedynczych komponentów (C, N, P, Fe). Różnice te wydają się wynikać głównie z warunków wzrostu poszczególnych gatunków *Glomus* (temperatura, wilgotność, gleba, roślina). Badania Steinberg i Rilliga [61] dotyczące przechowywania gleby uwilgotnionej inkubowanej w ciemności w 18°C potwierdzają niewielkie różnice w zawartości glomaliny. Podczas inkubacji gleby długość strzępek spadła o 60% po 150 dniach inkubacji natomiast zawartość glomaliny ogólnych spadła o 25%, z kolei zawartość białek IRTG (*immunoreactive total glomalinal*) zniknęła prawie całkowicie, zawartość łatwo-

ekstrahowalnych glomaliny EEG (*easily extractable glomalinal*) nie uległa zmianie, natomiast zawartość białka IREEG – immunoreaktywnych łatwoekstrahowalnych glomaliny (*immunoreactive easily extractable glomalinal*) wzrosła pięciokrotnie. W innym doświadczeniu [44] zawartość glomaliny ogólnych zmniejszyła się o 48 do 81% a glomaliny łatwoekstrahowalnych o 51 do 88% po 413 dniach inkubacji próbek glebowych w ciemności w temperaturze 20°C .

5. Występowanie glomaliny

Glomaliny występują powszechnie w różnych typach gleb [14, 16, 26, 36, 37, 62, 76]. Znalezione je zarówno w glebach uprawianych rolniczo, glebach leśnych, łąkowych oraz nieużytkach rolnych (Tabela III). Skład szaty roślinnej biotenu jest charakterystyczny dla określonego klimatu, choć bogactwo gatunków może być różne w zależności od położenia geograficznego i historii flory. Największe stężenie glomaliny odnotowano w tropikalnych glebach leśnych na Hawajach (ponad $100 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ gleby) [45, 48], natomiast najniższe stężenie glomaliny (poniżej $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ gleby) stwierdzono w glebach pustynnych [45]. Gleby lasów tropikalnych, ze względu na wysoką temperaturę i dużą wilgotność, charakteryzują się niskim stężeniem glomaliny $0,7\text{--}1,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ w przeciwieństwie do gleb z klimatu umiarkowanego i podzwrotnikowego, gdzie zaznacza się wysokie stężenie glomaliny nawet do $100 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ gleby, co tłumaczy się szybkimi zmianami klimatu, wysokim stężeniem żelaza w glebie oraz wysokim poziomem dwutlenku węgla w atmosferze stymulującym wzrost grzybów AMF [30, 31].

W badaniach Wright i Upadhyaya [73] na glebach leśnych stwierdzono zawartość glikoproteiny mieszczącą się w przedziale od 21 mg do 150 mg na g gleby. Zawartość glomaliny w glebach uprawnych Ameryki Południowej wahała się od około 2 mg do 15 mg $\cdot \text{g s.m.}$ gleby [36].

Skład szaty roślinnej biotenu oraz właściwości fizykochemiczne i biologiczne gleb, w tym zawartość węgla organicznego ma duże znaczenie w produkcji glomaliny przez grzyby AMF (Tabela IV). Aktywnie rozwijające się strzępki grzybów w glebie leśnej mogą wytwarzać od około 4 do prawie 17 mg glomaliny na miligram suchej masy grzybni [73].

W glebach uprawianych rolniczo w strefie klimatu umiarkowanego można stwierdzić ogólną zawartość glomaliny w zakresie od $0,35\text{--}0,75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ gleby [69]. W glebach użytków zielonych (łąka, pastwisko) klimatu umiarkowanego zawartość glomaliny mieści się w zakresie od $0,2\text{--}2,7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ gleby [32, 36]. Zawartości te są znacznie wyższe w glebach leśnych klimatu umiarkowanego i mieszczą się w zakresie $0,6\text{--}5,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ gleby [26,

Tabela III
Stężenia glomalin w zależności od środowiska

Środowisko (biom)	Lokalizacja	Immunoaktywne białko glebowe (IRSP) [g kg ⁻¹ gleby]	Literatura
gleba uprawna	Watkinsville, USA	0,56	[14]
gleba uprawna	Akron, USA	0,71	[65, 69]
gleba uprawna	RZD IUNG-PIB Kępa-Osiny, Polska	0,35-0,14 (TG, EEG)	[16]
las borealne	Delta Junction, USA	1,1	[62]
las klimatu umiarkowanego (puszcza)	Arch Rock, USA	1,3	[26]
puszcza	Cecil, GA	0,60	[36, 37]
puszcza	Lubrecht Experimental Forest, Montana USA	1,2	[61]
puszcza	Cordillera de Piuchué, Chile	4,9	[62]
puszcza	Duke Forest, USA	5,8	[62]
użytki zielone (łąka)	Missoula, USA	2,5	[32]
użytki zielone (łąka)	Pawnee, USA	0,29	[37]
użytki zielone (łąka)	Jasper Ridge, CA	0,82	[44]
las tropikalne	La Selva, Costa Rica	2,6	[30]
las tropikalne	Hawaii Volcanoes National Park and Kokee State Park, HI	9,2	[62]
las tropikalne	Hawaiian archipelago	13,5	[45]
pustynia	Jornada del Muerto, Nowy Meksyk	0,003	[6]
pustynia	Alicante, Hiszpania	0,11	[48]
pustynia	Sevilleta, Nowy Meksyk	0,13	[62]

Tabela IV
Zależność stężenia glomalin od obecności grzybów AM i glebowej materii organicznej w próbkach glebowych [9, 62]

Środowisko	Immunoaktywne białko glebowe (IRSP) [g kg ⁻¹ gleby]	Obecność grzybów AM [km skolonizowanych korzeni m ⁻² gleby]	Glebowa materia organiczna [kg C m ⁻² gleby]
gleba uprawna	0,53	1,5	nb
las borealny	1,1	0,28	19,3
pustynia	0,079	0,36	1,4
puszcza	2,5	0,31	12,7
łąka	0,69	17,74	13,3
las tropikalny	7,0	0,31	19,1

62]. Z kolei w borealnych lasach klimatu umiarkowanego (tajga) charakteryzującego się szerokim zakresem zmian temperaturowych (od -30°C do +20°C) zawartość glomalin przekracza 1 g·kg⁻¹ gleby [26]. Znacznie wyższe wartości glomalin ogólnych (3–14 g·kg⁻¹ gleby) można natomiast stwierdzić w tropikalnych lasach deszczowych [30]. Panujący tam mikroklimat charakteryzujący się wysoką temperaturą o niskich amplitudach dobowych i rocznych oraz wysokiej wilgotności powietrza sprzyja rozwojowi grzybów mykoryzowych a tym samym produkcji glomaliny. Najniższe zawartości glomaliny stwierdzono natomiast w glebach pustynnych, zaledwie 0,003–0,12 g·kg⁻¹ gleby [45]. Gleby te występujące na obszarach o bardzo niskim

zakresie opadów od 100 do 150 mm w ciągu roku oraz bardzo słabo zaznaczonym poziomie próchnicznym i silnym zasoleniu. Takie warunki nie są korzystne do rozwoju szaty roślinnej a tym samym symbiozy z grzybami mykoryzowymi.

Większość badań nad zawartością glomalin w glebie prowadzona była w powierzchniowej jej warstwie (0–30 cm), niemniej jednak znane są również badania prowadzone w głębszych warstwach gleby. Singh i inni stwierdził obecność glomaliny nawet na głębokości 140 cm profilu gleby [59]. Znaczne zawartości glomaliny stwierdzono także na glebach zalewowych w dolinach rzecznych i osadzie. W osadzie rzeczonym potwierdzono stężenie glomalin w ilości 9.66 mg·g⁻¹ [60].

6. Terminologia i metodyka oznaczeń

W terminologii dotyczącej glomalin możemy wyróżnić cztery główne grupy nazewnictwa w zależności od zastosowanej metodyki oznaczeń. Są to: białko glebowe oznaczane metodą Bradford (BRSP), łatwoekstrahowalne białko glebowe oznaczone metodą Bradford (EE-BRSP), immunoreaktywne białko glebowe (IRSP) oraz łatwoekstrahowalne immunoreaktywne białko glebowe (EE-IRSP) (Tabela V) [43, 51]. Nazewnictwo to dotyczy zarówno procesu ekstrakcji (glomalin ogólnie i glomalin łatwoekstrahowalne) oraz metody ich oznaczenia (metoda Bradford, metoda ELISA).

Ze względu na małą rozpuszczalność w wodzie ekstrakcję glomalin prowadzi się w wysokiej temperaturze (121°C; 250°F) w buforze cytrynianowym o odczynie neutralnym lub alkalicznym [36, 74, 75]. Łatwoekstrahowalne frakcje glomalin (EEG) z gleby ekstrahuje się 20 mM buforem cytrynianowym pH 7,0 przez 30 minut przy 121°C, natomiast ogólną zawartość glomalin (TG)

wyznacza się przy użyciu 50 mM buforu cytrynianowego przy pH 8,0 przez 60 minut w temp. 121°C, według metody opisanej przez Wright i Upadhyaya [74, 75].

W celu określenia stężenia glomaliny stosuje się metodę ilościowego oznaczania białka opisaną przez Bradford [8]. Metoda Bradford wykorzystuje fakt przesunięcia maksimum absorpcji roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 z 465 nm do 595 nm po związaniu z białkiem. Częsteczka barwnika CBB oddziałuje poprzez grupy SO_3^- z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi. Z barwnikiem reagują głównie reszty argininy, w mniejszym stopniu reszty histydyny, lizyny, tyrozyny, tryptofanu i fenyloalaniny. Błękit brylantowy Coomassie G-250 w środowisku kwaśnym ma brunatne zabarwienie, które po reakcji z białkiem zmienia się na błękitne. Natężenie barwy jest proporcjonalne do zawartości białka w roztworze [8, 22, 74]. Pomiar spektrofotometryczny zmiany barwy roztworu białka odczytuje się przy długości fali 590 nm (A590), przy użyciu surowiczej albuminy wołowej (BSA)

Tabela V
Terminologia glomalin [43]

Terminologia	Symbol	Opis
glomalina	–	glikoproteina produkowana przez grzyby mykoryzy arbuskularnej; jeszcze nie do końca zidentyfikowany produkt grzybów AMF
glomalin ogólnie (<i>total glomalin</i>)	TG	frakcja glomalin gleby kilkukrotnie ekstrahowana przy użyciu 50 mM buforu cytrynianowego (pH 8,0), w autoklawie w temperaturze 121°C przez 60 minut
glomalin łatwoekstrahowalne (<i>easily extractable glomalin</i>)	EEG	frakcja glomalin gleb ekstrahowana jednorazowo przy użyciu 20 mM buforu cytrynianowego (pH 7,0) w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut
białko glebowe spokrewnione z glomalinami (<i>glomalin-related soil protein</i>)	GRSP	stanowi łączny udział glomalin w glebie, ewentualnie zawiera inne białko gleby; jest to frakcja glomalin gleby kilkukrotnie ekstrahowana przy użyciu 50 mM buforu cytrynianowego (pH 8,0), w autoklawie w temperaturze 121°C przez 60 minut
łatwoekstrahowalne białka glebowe spokrewnione z glomalinami (<i>easily extractable glomalin-related soil protein</i>)	EE-GRSP	łączna frakcja glomalin łatwoekstrahowalnych oraz innych białek glomalinopodobnych spokrewnionych z glomalinami; frakcja glomalin gleb ekstrahowana raz przy użyciu 20 mM buforu cytrynianowego (pH 7,0) w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut
białko glebowe oznaczane metodą Bradford (ang. <i>Bradford-reactive soil protein</i>)	BRSP	ogólne białko glebowe oznaczone metodą Bradford; łączne oznaczenie glomalin i innych białek w całym ekstrakcie glebowym; ekstrakcja przeprowadzana jak w przypadku glomalin TG
łatwoekstrahowalne białko glebowe oznaczone metodą Bradford (ang. <i>easily extractable Bradford-reactive soil protein</i>)	EE-BRSP	łatwoekstrahowalne białko glebowe oznaczone metodą Bradford; łączne oznaczenie glomalin łatwoekstrahowalnych i innych białek w całym ekstrakcie glomalin; ekstrakcja przeprowadzana jak w przypadku glomalin EEG
immunoaktywne białko glebowe (<i>immunoreactive soil protein</i>)	IRSP	białko glebowe oznaczone przy użyciu testu ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla glomalin MAb32B11; w tym przypadku nie mogą reagować inne białka poza glomalinami; ekstrakcja przeprowadzana jak w przypadku glomalin TG
łatwoekstrahowalne immunoaktywne białko glebowe (<i>easily extractable immunoreactive soil protein</i>)	EE-IRSP	łatwoekstrahowalne białko glebowe oznaczone przy użyciu testu ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla glomalin MAb32B11; w tym przypadku nie mogą reagować inne białka poza łatwoekstrahowanymi glomalinami; ekstrakcja przeprowadzana jak w przypadku glomalin EEG

jako standardu w zakresie od 1,25 do 50 µg (BSA) w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS). Z uzyskanej krzywej wzorcowej odczytuje się zawartości glomalin ogólnych i łatwoekstrahowalnych [43].

Terminologię stosowaną w pracach analizy glomalin podano w Tabeli V na podstawie publikacji Rilliga [43]. Oprócz znanego w literaturze nazewnictwa glomalin (TG, EEG) Rillig [43] zaproponował także definicję tzw. białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP) oraz tzw. białek glebowych oznaczanych metodą Bradford (*Bradford-reactive soil protein* BRSP) [54].

W przypadku określenia ogólnej zawartości glomalin (TG) stosuje się również test immunoenzymatyczny tzw. metodę ELISA jeden z najpowszechniej stosowanych testów w badaniach biologicznych, zarówno naukowych, jak i diagnostycznych. Służy on do wykrycia określonych białek w badanym materiale z użyciem przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych skoniugowanych z odpowiednim enzymem [59, 60]. Przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla glomaliny są przeciwciała MAb32B11 [68]. W podstawowej wersji testu ELISA, pewna ilość antygeny unieruchomiona jest na powierzchni fazy stałej. Wykonanie testu rozpoczyna się od wprowadzenia materiału biologicznego, w którym badana będzie obecność przeciwciał specyficznych dla unieruchomionego antygeny. Unieruchomiony antygen i specyficzne dla niego przeciwciała – o ile są obecne w materiale biologicznym – tworzą kompleks, dzięki któremu przeciwciało zostaje trwale związane z podłożem. Po przepłukaniu środowiska reakcji, dodawany jest tzw. koniugat czyli przeciwciało skierowane przeciw przeciwciałom swoistym połączone wiązaniem kowalencyjnym z enzymem. Po ponownym przepłukaniu środowiska reakcji i dodaniu odpowiedniego substratu, enzym zawarty w koniugacie katalizuje reakcję, której produkt (najczęściej barwny) można ocenić ilościowo metodą spektrofotometryczną, służącą do pomiaru intensywności barwy. Poziom intensywności barwy, zależny od stężenia produktu reakcji enzymatycznej, jest proporcjonalny do stężenia przeciwciał w próbce. Równoległe do próbek badanych, przeprowadza się analogiczne etapy reakcji dla tzw. surowic kalibracyjnych (kalibratorów) o znanym stężeniu badanego przeciwciała [68]. Wyniki uzyskane dla kalibratorów pozwalają wykreślić krzywą kalibracyjną, stanowiącą wykres zależności intensywności barwy od

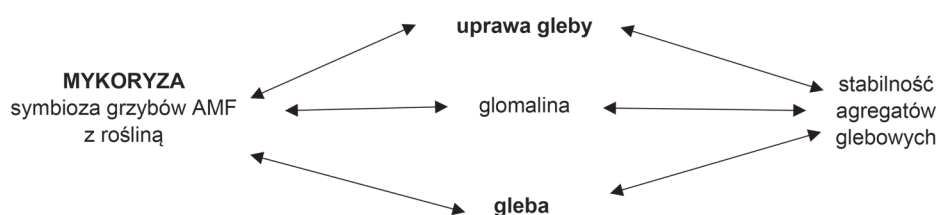
stężenia przeciwciał w próbce. Z równania krzywej kalibracyjnej oblicza się stężenie przeciwciał w próbkach badanych. W przypadku oznaczeń ogólnej zawartości glomalin metodą tą oznacza się immunoreaktywne białko glebowe zaś w przypadku glomalin łatwoekstrahowalnych oznacza się – łatwoekstrahowalne immunoreaktywne białko glebowe [43]. Oznaczenia glomalin ogólnych mogą być często niemiernodajne, ponieważ oprócz typowych glomalin test może wykryć również inne białka należące do glebowej frakcji organicznej a niekoniecznie same glomaliny [34]. Bardziej wiarygodne w ocenie trwałości agregatów glebowych staje się więc oznaczenie białek EEG, których wartości mogą odzwierciedlać rzeczywistą zawartość glomalin w glebie [65, 66]. Tłumaczyć to można także tym, iż glomaliny ogólne charakteryzuje znacznie mniejsza immunoreaktywność w porównaniu do łatwoekstrahowalnych glomalin, które można wykryć z użyciem przeciwciał monoklonalnych [68].

7. Funkcje glomalin

Glomaliny odgrywają znaczącą rolę głównie w tworzeniu gruzelkowatej struktury gleby, ułatwiając zlepianie cząstek mineralnych (Rys. 3) [70, 73]. Białko to obkleja powierzchnię cząsteczek gleby, tworzy również charakterystyczną powłokę na ich powierzchni. Z badań Rillig i wsp. [47] wynika, iż glomaliny stanowią około 2% ogólnej wagi agregatów glebowych oraz od 4 do 5% całkowitego C i N w glebach.

Tak więc, nawet tylko pod względem ilościowym frakcja glomalin jest bardzo istotną frakcją glebowej materii organicznej [70]. Znając również właściwości glomalin, a zwłaszcza jej hydrofobowość i wyżej wspomnianą trwałość w środowisku glebowym, łatwo mogli zakładać odkrywcy tej frakcji MO, że odgrywa ona ważną rolę w tworzeniu i stabilizacji gruzelkowatej struktury gleb. Stąd też poprzez produkcję glomalin grzyby te budzą rosnące zainteresowanie jako potencjalny czynnik wspomagania wzrostu i zdrowotności roślin oraz poprawy struktury gleby.

Silnie hydrofobowy, polisacharydowy łańcuch glomalin jest odpowiedzialny także za wyłapywanie i przyłączanie do siebie drobnych cząstek glebowych a nawet mikroorganizmów. W ten sposób dobrze zagregowana



Rys. 3. Funkcje glomalin

struktura gleby utrzymuje odpowiednie przewietrzanie, wilgotność oraz odpowiedni skład komponentów niezbędnych do optymalnego wzrostu uprawianych roślin [19, 69]. Rola grzybów AMF w agregacji, a tym samym zwiększeniu infiltracji wody, ochronie materii organicznej (SOM) przed rozkładem, wzroście odporności gleb na erozję, wydaje się tak samo ważna, a może nawet ważniejsza niż rola w absorpcji składników pokarmowych. Dlatego kontrola wzrostu grzybów mykoryzowych i produkcja glomaliny mogą być przydatne do monitorowania pustynnienia i degradacji gleby [14]. W badaniach Franzluebbers i wsp. [14] stabilność agregatów glebowych była słabiej skorelowana z zawartością glomaliny, co autorzy tłumaczą wieloletnim charakterem poszczególnych systemów uprawy, a więc ustabilizowanym środowiskiem glebowym oraz dodatkowo wysoką zawartością materii organicznej w glebie.

Stwierdzono, że istnieje bardzo ścisła zależność pomiędzy długością strzępek grzybów w glebie a ilością w niej agregatów wodoodpornych [19]. Dotychczasowe badania z tego zakresu rzeczywiście wykazały istotne zależności pomiędzy zawartością glomaliny w 1–2 mm gruzełkach glebowych, a ich stabilnością (wodoodpornością) [69].

Ponadto udowodniono, że grzyby AMF chronią rośliny przed takimi patogenami, jak *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* a także przed atakiem nicieni [3]. Mechanizm obrony polega na tworzeniu bariery fizycznej i produkcji antybiotyków. Grzyby AMF oprócz węglowodanów i fosforu pobierają także cynk i miedź, a w warunkach deficytu tych pierwiastków znacznie podnoszą plony [48]. Badania nad ochroną roślin motylkowatych zainfekowanych AMF – na przykładzie *Vicia faba* – rosnących na glebie o wysokiej zawartości manganu dowiodły, że mykoryza skutecznie chroniła je przed toksycznym działaniem tego pierwiastka [3]. Metale ciężkie wiązane są przez grupy karboksylowe związków pektynowych (hemielulozy) wypełniających przestrzeń pomiędzy grzybem a komórką roślinną. Przypuszcza się, że w proces ten zaangażowane są także glomaliny [3].

W literaturze znana jest również rola glomaliny w tolerancji roślin na stres [15, 18, 41]. Z badań Gadkar i Rilliga [15] wynika, iż glomaliny mogą być związane z białkiem szoku cieplnego *hsp60* (*heat shock proteins*). Ekspresja tych białek wzrasta kiedy komórki są narażone na działanie czynników stresowych, m.in. podwyższonej temperatury, ale również niskiej temperatury, stresu solnego, osmotycznego i metali ciężkich. Produkcja białek *hsp* może wzrastać także w odpowiedzi na infekcję, zapalenie, działanie toksyn, promieniowanie UV, głodzenie, niedotlenienie itp. Białka *hsp* działają jako białka opiekuńcze odpowiedzialne za prawidłowe zwijanie się innych białek, ich oligomeryzację, translokację oraz degradację. Funkcje tych

białek są podobne u wszystkich organizmów żywych a ich sekwencja aminokwasowa jest silnie konserwatywna. Porównanie glomaliny z białkami szoku cieplnego może pozwolić na wyjaśnienia w jaki sposób stres dotykający komórki grzyba tj. metale ciężkie, skażenie gleby, zmiany klimatyczne może spowodować zwiększenie produkcji glomaliny i wzrost grzybni [18, 41]. Niesprzyjające do wzrostu grzybów endomycoryzowych warunki mogą zatem być powodem zwiększenia przez nie produkcji glomaliny – ochrona grzybni przyczynia się do możliwości wzrostu grzyba w skażonych glebach [25, 41].

8. Czynniki wpływające na spadek produkcji glomaliny

Na produkcję glomaliny ma wpływ wiele czynników zarówno środowiskowych, glebowych jak i klimatycznych. Podstawowy czynnikiem wpływającym na znaczną produkcję glomaliny są optymalne warunki do rozwoju grzybów AMF wynikiem czego jest aktywna symbioza pomiędzy rośliną a grzybem [17, 27, 63]. Stopień zasiedlenia korzeni roślin przez grzyby AMF może być regulowany dodatkowo przez podatność rośliny na infekcję jak i poprzez aktywność infekcyjną spor tych grzybów występujących w glebie, w której wzrasta dana roślina [63]. Liczebność i aktywność symbiotyczna grzybów AMF a tym samym wzrost produkcji glomaliny może być zwiększona zarówno poprzez modyfikację warunków glebowych sprzyjających namnażaniu i aktywności spor, jak i przez wprowadzanie do ryzoferu wyselekcjonowanych drobnoustrojów wspomagających proces mykoryzacji. Głównymi wyznacznikami produkcji glomaliny są zarówno gatunek grzyba tworzącego symbiozę jak i rodzaj rośliny [62]. Znane są liczne prace, w których autorzy potwierdzają korelację wzrostu roślin z kolonizacją korzeni przez grzyby mykoryzowe. Idzie za tym również korelacja wzrostu rośliny i a tym samym produkcji glomaliny [63]. Szereg roślin tj. stokłosa bezostna (*Bromus inermis*), trawa sudańska (*Sorghum bicolor*), babka lancetowata (*Plantago lanceolata*) wykazuje aktywną symbiozę z grzybami AMF [27, 63]. W przypadku tych roślin stwierdzono istotny wzrost plonu z jednoczesnym stwierdzeniem znacznych ilości białka spokrewnionego z glomalinami (tzw. białka GRP) w korzeniach roślin i w glebie ryzoferowej [51]. W warunkach polowych, wpływ rośliny na produkcję glomaliny może być bardziej widoczny niż efekt obserwowany w kontrolowanych warunkach na przykładzie pojedynczego rodzaju rośliny i gatunku grzyba [62]. Wilson i wsp. [64] potwierdzili pewną specyfikę układu gatunkowego symbioz AMF i poziomu glomaliny w strzępkach grzybowych.

Do czynników niekorzystnie wpływających na prawidłowe funkcjonowanie mykoryzy arbuskularnej

należą m.in: uprawa mechaniczna, stosowanie środków ochrony roślin, intensywne nawożenie, wprowadzenie zanieczyszczeń z nawozami naturalnymi [43]. Również właściwości fizykochemiczne gleb oraz stosowany system uprawy roli ma istotny wpływ na zawartość glomaliny w glebie [50, 65].

9. Podsumowanie

Stabilność struktury gleby istotnie wpływa na charakter i zawartość materii organicznej w glebie. Użytkowanie gruntów i stosowanie szeregu zabiegów uprawowych ma wpływ na ilość i jakość materii organicznej gleby a tym samym na jej agregację. Grzyby mykoryzowe są jednym z najważniejszych czynników biotycznych warunkujących jakość środowiska glebowego. Odgrywają bardzo ważną rolę w ekosystemach agrarnych, a poprzez produkcję glomaliny mogą stanowić istotny czynnik pozytywnego oddziaływania na wzrost i zdrowotność roślin w każdym systemie uprawy, a także można je wykorzystać w zabiegach poprawiających strukturę gleby, przy stabilizacji gruntów na obszarach podatnych na erozję i gruntów poddawanych rekultywacji. Można spodziewać się, że w przyszłości dokładniej poznana budowa i funkcje glomaliny przyczynią się do uzyskania znacznych efektów wzrostu roślin w uprawach polowych. Skuteczność kompleksowego podejścia do problemów wzajemnych oddziaływań pomiędzy roślinami i drobnoustrojami glebowymi potwierdzają liczne badania, gdzie uwzględniono nie tylko dobór roślin do określonych warunków glebowych ale również wykorzystywanie wspomagającej ich wzrost mikroflory glebowej. W wielu ośrodkach badawczych prowadzone są intensywne badania nad możliwością wykorzystania drobnoustrojów glebowych, w tym także grzybów AMF w praktyce rolniczej. Produkcja glomaliny i jej rola w stabilizacji struktury gleby staje się więc dla środowiska glebowego alternatywną metodą wspierającą rolnictwo zrównoważone.

Piśmiennictwo

- Bai Ch., He X., Tang H., Shan B., Zhao L.: Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi, glomalin and soil enzymes under the canopy of *Astragalus adsurgens* Pall. in the Mu Us sandland, China. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 941–947 (2009)
- Barea J.M., Pozo M.J., Azcon R., Azcon-Aguilar C.: Microbial cooperation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**, 1761–1778 (2005)
- Bedini S., Pellegrino E., Avio L., Pellegrini S., Bazzoffi P., Argeese E., Giovannetti M.: Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 1491–1496 (2009)
- Bedini S., Turrini A., Rigo Ch., Argeese E., Giovannetti M.: Molecular characterization and glomalin production of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing a heavy metal polluted ash disposal island, downtown Venice. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 758–765 (2010)
- Bielińska E.J., Kolodziej B., Sugier D.: Relationship between organic carbon content and the activity of selected enzymes in urban soils under different anthropogenic influence. *J. Geochem. Explor.* **129**, 52–56 (2013)
- Bird S.B., Herrick J.E., Wander M.M., Wright S.F.: Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. *Environ. Pollut.* **116**, 445–455 (2012)
- Błaszczkowski J.: Przeszłość, teraźniejszość i przyszłość klasyfikacji arbuskularnych grzybów mikoryzowych. *Kosmos*, **53**, 17–24, 2004
- Bradford M.M.: A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976)
- Burrows R. L.: Glomalin Production and Infectivity of Arbuscular-Mycorrhizal Fungi in Response to Grassland Plant Diversity. *Am. J. Plant Sci.* **5**, 103–111 (2014)
- Buyer J.S., Zuberer D.A., Kristine A., Nichols K.A., Franzluebbers A.J.: Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection. *Plant Soil*, **339**, 401–412 (2011)
- Driver J.D., Holben W.E., Rillig M.C.: Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 101–106 (2005)
- Feeney D.S., Daniell T., Hallett P.D., Illian J., Ritz K., Young I.M.: Does the presence of glomalin relate to reduced water infiltration through hydrophobicity? *Can. J. Soil Sci.* **84**, 365–372 (2004)
- Frank V. Schindler F.V., Mercer E.J., Rice J.A.: Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 320–329 (2007)
- Franzluebbers A.J., Wright S.F., Stuedemann J.A.: Soil aggregation and glomalin under pastures in the Southern Piedmont USA. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **64**, 1018–1026 (2000)
- Gadkar V., Rillig M.C.: The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiol. Lett.* **263**, 93–101 (2006)
- Gałązka A.: Charakterystyka glomaliny i oddziaływania różnych systemów uprawy na ich zawartość w glebie. *Pol. J. Agronom.* **15**, 75–82 (2013)
- Gerdemann J.W.: Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annu. Rev. Phytopath.* **6**, 397–418, (1968)
- Gillespie A.W., Farrell R.E., Walley F.L., Ross A.R.S., Leinweber P., Eckhardt K.-U., Regier T.Z., Blyth R.I.R.: Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 766–777 (2011)
- Guo H., He X.L., Li Y.P.: Spatial distribution of arbuscular mycorrhiza and glomalin in the rhizosphere of *Caragana korshinskii* Kom. in the Otindag sandy land, China. *Afr. J. Microbiol. Res.* **6**, 5745–5753 (2012)
- Hallett P.D., Feeney D.S., Bengough A.G., Rillig M.C., Scrimgeour C.M., Young I.M.: Disentangling the impact of AM fungi versus roots on soil structure and water transport. *Plant Soil*, **314**, 183–196 (2009)
- Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., Wenzel W.W.: Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* **168**, 293–303 (2005)

22. Hontoria Ch., Velasquez R., Benito M., Almorox J., Moliner A.: Bradford-reactive soil proteins and aggregate stability under abandoned versus tilled olive groves in a semi-arid calcisol. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 1583–1585 (2009)
23. Idris A., Labuschagne N., Korsten L.: Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. *J. Agric. Sci.* **147**, 17–30 (2009)
24. Kamieński F.: Die Vegetationsorgane der *Monotropa hypopitys*. *L. Bot. Zeitschr.* **29**, 225–234 (1881)
25. Khan A.G.: Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on the trace metal contaminated soils in the phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Bio.* **18**, 355–364 (2005)
26. Knorr M.A., Boerner R. E. J., Rillig M. C.: Glomalin content of forest soils in relation to fire frequency and landscape position. *Mycorrhiza*, **13**, 205–210 (2003)
27. Koide R.T., Mosse B.: A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, **14**, 145–163 (2004)
28. Lee J.E., Eom A.-H.: Effect of Organic Farming on Spore Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Glomalin in Soil. *Mycobiology*, **37**, 272–276 (2009)
29. Liu Q.M., Cao Y.L., Huang Y.F., Zhang Y.P., Lin J.Q., Lin J.M., Xu L.S.: Soil organic matter dynamics after C₃-C₄ vegetation change of red soil in southern China: Evidence from natural ¹³C abundance. *Contemp. Probl. Ecol.* **6** (5), 513–519 (2013)
30. Lovelock C.E., Wright S.F., Nichols K.A.: Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1009–1012 (2004)
31. Lovelock C.E., Wright S.F., Nichols K.A.: Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rainforest soil. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1009–1012 (2004)
32. Lutgen E.R., Muir-Clairmont D., Graham J., Rillig M.C.: Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. *Plant Soil*, **257**, 71–83 (2003)
33. Miller R.M., Jastrow J.D.: Mycorrhizal fungi influence soil structure. *Molecul. Biol. Physiol.* **40**, 3–18 (2000)
34. Mirás-Avalos J.M., Antunes P.M., Koch A., Khosla K., Klironomos J.N., Dunfield K.E.: The influence of tillage on the structure of rhizosphere and root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Pedobiologia*, **54**, 235–241 (2011)
35. Newman E.I.: Mycorrhizal links between plants: their functioning and ecological significance. *Adv. Ecol. Res.* **18**, 243–270 (1988)
36. Nichols K.A., Wright S.F.: Comparison of glomalin and humic acid in eight native US soils. *Soil Sci.* **170**, 985–997 (2005)
37. Nichols K.A., Wright S.F.: Carbon and nitrogen in operationally-defined soil organic matter pools. *Biol. Fertil. Soils*, **43**, 215–220 (2006)
38. Oades J.M.: Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant Soil*, **76**, 319–337 (1984)
39. Parniske M.: Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* **6**, 763–775 (2008)
40. Phillips R.P., Fahey T.J.: The influence of soil fertility on rhizosphere effects in northern hardwood forest soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **72**, 453–461 (2008)
41. Purin S., Rillig M.C.: The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia*, **51**, 123–130 (2007)
42. Rillig M.C., Mummey D.L.: Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* **171**, 41–53 (2006)
43. Rillig M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can J. Soil. Sci.* **84**, 355–363 (2004)
44. Rillig M.C., Maestre F.T., Lamit L.J.: Microsite differences in fungal hyphal length, glomalin, and soil aggregate stability in semiarid Mediterranean steppes. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 1257–1260 (2003)
45. Rillig M.C., Ramsey P.W., Morris S., Paul E.A.: Glomalin, an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant Soil*, **253**, 293–299 (2003)
46. Rillig M.C., Steinberg P.D.: Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biol. Biochem.* **34**, 1371–1374 (2002)
47. Rillig M.C., Wright S.F., Eviner V.T.: The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant Soil*, **238**, 325–333 (2002)
48. Rillig M.C., Wright S.F., Nichols K.A., Schmidt W.F., Torn M.S.: Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil*, **233**, 167–177 (2001)
49. Rillig, M.C., Wright S.F., Kimball B.A., Pinter P.J., Wall G.W., Ottman M.J., Leavitt S.W.: Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a Sorghum field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. *Glob. Change Biol.* **7**, 333–337 (2001)
50. Roger-Estrade J., Anger Ch., Bertrand M., Richard G.: Tillage and soil ecology: Partners for sustainable agriculture. *Soil Till. Res.* **111**, 33–40 (2010)
51. Rosier C.L., Piotrowski S.J., Hoyer A.T., Rillig M.C.: Intraradical protein and glomalin as a tool for quantifying arbuscular mycorrhizal root colonization. *Pedobiologia*, **52**, 41–50 (2008)
52. Rosolem C.A., Calonego J.C.: Phosphorus and potassium budget in the soil-plant system in crop rotations under no-till. *Soil Till. Res.* **126**, 127–133 (2013)
53. Ruiz-Lozano J.M., Azcón R.: Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *G. deserticola* under salinity. *Mycorrhiza*, **10**, 137–143 (2000)
54. Ryan, M.H., Graham J.H.: Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant Soil*, **244**, 263–271 (2002)
55. Sarkar D., Kumar De D., Das R., Mandal B.: Removal of organic matter and oxides of iron and manganese from soil influences boron adsorption in soil. *Geoderma*, 214–215, 213–216 (2014)
56. Schüssler A.: Phylogeny and taxonomy of *Glomeromycota* ('arbuscular mycorrhizal (AM) and related fungi'), <http://www.amf-phylogeny.com> (18 marca 2015 roku)
57. Schüssler A., Schwarzott D., Walker C.: A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* **105**, 1413–1421 (2001)
58. Simansky V., Bajcan D., Ducsay L.: The effect of organic matter on aggregation under different soil management practices in a vineyard in an extremely humid year. *Catena*, **101**, 108–113 (2013)
59. Singh P.K., Singh M., Tripathi B. N.: Glomalin: an arbuscular mycorrhizal soil protein. *Protoplasma*, **250**, 663 – 669 (2013)
60. Singh P. K.: Role of glomalin related soil protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Agric. Sci. Res. J.* **2**, 119–125 (2012)
61. Steinberg P.D., Rillig M.C.: Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 191–194 (2003)
62. Treseder K.K., Turner K.M.: Glomalin in ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **71**, 1257–1266 (2007)
63. Violi H.A., Treseder M.J.A., Wright S.F., Lovatt C.J.: Density dependence and interspecific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi mediated plant growth, glomalin production, and sporulation. *Can. J. Bot.* **85**, 63–75 (2007)

64. Wilson G. W. T., Rice C. W., Rillig M. C., Springer A., Hartnett D. C.: Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecol. Lett.* **12**, 452–461 (2009)
65. Wright S.F., Green V.S., Cavigelli M.A.: Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. *Soil Till. Res.* **94**, 546–549 (2007)
66. Wright S.F., Nichols K.A., Schmidt W.F.: Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and in soil. *Chemosphere*, **64**, 1219–1224 (2006)
67. Wright S.F., Jawson L.: A pressure cooker method to extract glomalin from soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **65**, 1734–1735 (2001)
68. Wright S.F.: A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, **226**, 171–177 (2000)
69. Wright S.F., Anderson R. L.: Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. *Biol. Fert. Soils* **31**, 249–253 (2000)
70. Wright S.F., Starr J.L., Paltineanu I.C.: Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**, 1825–1829 (1999)
71. Wright S.F., Upadhyaya A.: Quantification of arbuscular mycorrhizal activity by the glomalin concentration on hyphae. *Mycorrhiza*, **8**, 283–285 (1999)
72. Wright S.F., Upadhyaya A.: Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soil by capillary electrophoresis. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 1853–1857 (1998)
73. Wright S.F., Upadhyaya A.: A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, **198**, 97–107 (1998)
74. Wright S.F., Franke-Snyder M., Morton J.B., Upadhyaya A.: Time course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil*, **181**, 193–203 (1996)
75. Wright S.F., Upadhyaya A.: Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein from arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* **161**, 575–586 (1996)
76. Wu F.S., Dong M. X., Liu Y.J., Ma X.J., An L.Z., Young J.P.W., Feng H.Y.: Effects of long-term fertilization on AM fungal community structure and glomalin-related soil protein in the Loess Plateau of China. *Plant Soil*, **342** (1–2), 233–247 (2011)
77. Wu Q.S., He X.H., Zou Y.N., He K.P., Sun Y.H., Cao M.Q.: Spatial distribution of glomalin-related soil protein and its relationships with root mycorrhization, soil aggregates, carbohydrates, activity of protease and β -glucosidase in the rhizosphere of Citrus unshiu. *Soil Biol. Biochem.* **45**, 181–183 (2012)

BADANIA SPELEOMIKOLOGICZNE W WYBRANYCH OBIEKTACH PODZIEMNEGO KOMPLEKSU RIESE (GÓRY SOWIE, DOLNY ŚLĄSK, POLSKA)

Rafał Ogórek^{1*}, Agnieszka Lejman²

¹Zakład Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

²Katedra Kształtowania Agroekosystemów i Terenów Zieleni, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wpłynęło w grudniu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka kompleksu Riese. 3. Metody używane do oceny jakości mikrobiologicznej powietrza. 4. Czynniki środowiskowe wpływające na liczebność grzybów w obiektach podziemnych. 5. Grzyby występujące w powietrzu wybranych obiektów kompleksu Riese. 6. Potencjalny szkodliwy wpływ grzybów wyizolowanych z powietrza wybranych obiektów kompleksu Riese na zdrowie ludzi. 7. Podsumowanie

Speleomycological research in the selected objects of underground Riese complex (Sowie Mountains, Lower Silesia, Poland)

Abstract: The term „speleomycology” was first introduced by Polish scientists in 2014 and it is now used to describe all kinds of investigations which aim at the recognition of cave and underground mycobiota. Microbiological quality of air is estimated by using microscopic or culture methods. In the underground objects, the culture method with a microbiological air sampler (collision technique) is commonly used. Most fungi can be found underground as spores, which entered the objects transported by air or water currents, by animals living in the caves (e.g. bats, arthropods) or by humans visiting the objects. However, the environment surrounding the underground objects and the air currents seem to have the most significant influence on fungi concentrations inside the objects. Riese complex was built between 1943–1945 in the Sowie Mts. (Lower Silesia, SW Poland), but its purpose still remains unclear. Fungi isolated from the air of the studied objects (i.e. Osówka, Rzeczka, Włodarz) can cause allergies and infections in humans. However, fungal spore concentration and number of species in Riese complex do not exceed norms of microbiological quality of air and, thus, do not present a health risk to the tourists.

1. Introduction. 2. Characteristics of the Riese complex. 3. Methods used for assessing the microbiological quality of air. 4. Environmental factors affecting the number of fungi in underground objects. 5. Airborne fungi occurring in the selected objects of underground Riese complex. 6. The potential harmful effect of airborne fungi isolated from the selected objects of Riese complex on human health. 7. Summary

Słowa kluczowe: podziemny kompleks Riese, metody badań, powietrze, speleomikologia

Key words: underground Riese complex, research methods, air, speleomycology

1. Wstęp

Badania mikologiczne obiektów podziemnych prowadzone są od lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia [4, 6, 11]. Jednakże pojęcie „speleomikologia” zostało po raz pierwszy użyte w literaturze światowej przez polskich naukowców w roku 2014. Oznacza ono całość badań naukowych mających na celu poznanie mikroflory jaskiń i innych obiektów podziemnych (sztolnie, kopalnie, bunkry, tunele itp.). Speleomikologia obejmuje badania składu gatunkowego, liczebności zarodników i innych organów tworzących kolonie grzybów zasiedlających skały, wodę, powietrze, materię organiczną oraz czynników wpływających na występowanie grzybów w obiektach podziemnych [57].

Ekosystem obiektów podziemnych w porównaniu do innych środowisk jest bardzo specyficzny i mało korzystny dla rozwoju mikroorganizmów. Panuje w nim stała niska temperatura i mała dostępność materii organicznej oraz światła. Dlatego większość grzybów w obiektach podziemnych występuje w postaci zarodników i rzadko spotykany jest aktywny wzrost grzybów

[15, 49, 53, 56, 57]. Każdy obiekt podziemny można podzielić na trzy strefy w zależności od dostępu światła i panującej temperatury. Pierwsza z nich to strefa mroku, w której występuje zwykle najwięcej grzybów i znajduje się w strefie wejściowej do obiektu. W drugiej strefie zwanej środkową, panuje względna ciemność i zmienna temperatura. Natomiast trzecia strefa zwana ciemną, charakteryzuje się brakiem dostępu światła i stałą niską temperaturą. Zwykle z niej izoluje się najmniej grzybów [29, 53].

W badaniach oceny mikologicznej powietrza wykorzystuje się metodę mikroskopową i hodowlaną. W metodzie mikroskopowej jest możliwość wykrywania w powietrzu żywych i martwych mikroorganizmów oraz można zaobserwować inne zanieczyszczenia biologiczne np. pyłki i roztacza. Jednakże w metodzie tej występują trudności w identyfikacji gatunkowej mikroorganizmów. W metodzie hodowlanej można wykryć tylko mikroorganizmy żywe, ale nie ma trudności w ich identyfikacji gatunkowej [27].

Powietrze atmosferyczne w porównaniu do gleby i wody jest środowiskiem nieprzyjawnym dla życia i roz-

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; tel. 511078318; e-mail: rafal-ogorek@wp.pl

woju mikroorganizmów, jednak zachowują one w nim swój potencjał infekcyjny. Najczęściej jest ono miejscem okresowego ich przebywania [27].

Drobnoustroje w powietrzu występują w postaci bioaerozoli, czyli układów zawierających fazę rozpraszającą w postaci powietrza oraz fazę rozproszoną składającą się z materiałów biologicznych (wirusy, pierwotniaki, komórki bakteryjne, fragmenty komórkowe roślin i zwierząt, fragmenty grzybnii grzybów, zarodniki, metabolity wtórne mikroorganizmów) [5, 21]. Bioaerozole stanowią około 5–34% zanieczyszczeń powietrza wewnętrznego, a ich faza rozproszona zazwyczaj jest o średnicy 0,3–100 µm [63]. Przykładowo, pojedyncze komórki i zarodniki przetrwalnikowe bakterii są wielkości od 0,5 do 2,0 µm (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp.), zarodniki grzybów mają większe rozmiary, np.: 2,8–3,2 µm *Trichoderma harizanum*, 3,0–4,5 µm *Aspergillus niger*, 3,5–5,0 µm *Aspergillus fumigatus*, 5,0–8,0 µm *Cladosporium macrocarpum*, 7,0–17,0 µm *Penicillium brevicompactum*, a 15,0–25,0 µm *Epiccocum nigrum* [36].

Składniki biologiczne powietrza mogą niekorzystnie wpływać na zdrowie ludzi i zwierząt. Pod względem działania chorobotwórczego, można je podzielić na: czynniki wywołujące choroby zakaźne i inwazyjne (np. wirusy, bakterie, grzyby), alergeny biologiczne (np. cząstki roślinne i zwierzęce), toksyny biologiczne (np. endotoksyna bakteryjna, mikotoksyny), czynniki rakotwórcze (aflatoksyny – toksyny o właściwościach rakotwórczych, wytwarzane głównie przez *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*) oraz biologiczne wektory, czyli stawonogi np. kleszcze i komary, przenoszące zarazki chorób transmisyjnych [21].

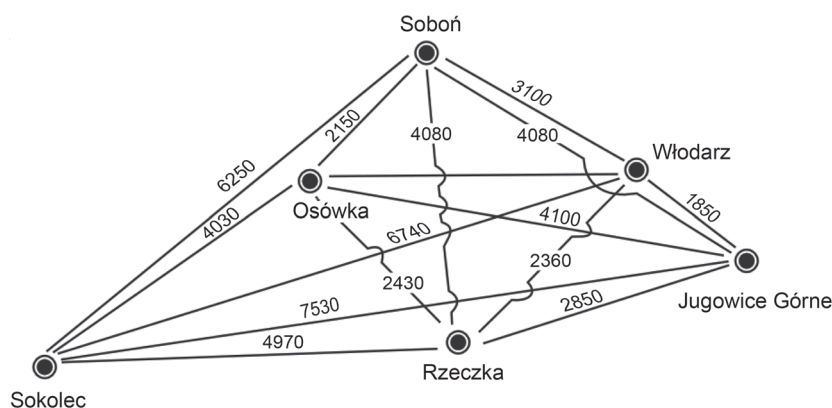
2. Charakterystyka kompleksu Riese

Kompleks Riese znajduje się w Górach Sowich. Łańcuch górski ma długość około 25 km i obejmuje teren na wschód od Wałbrzycha, o powierzchni około

300 km². Najwyższym szczytem tego pasma jest Wielka Sowa (1015 m n.p.m.). Jest to masyw górski o małym zaludnieniu, jedynie na jego obrzeżach znajdują się liczne miasta, wioski i osiedla [68].

Budowę kompleksu Riese rozpoczęto w roku 1943, pod specjalnie zakodowanym symbolem „S3”. Pod tym symbolem figurowały kwatery główne i fabryki broni specjalnego znaczenia. Ponadto, potężne fundamenty żelbetowe w niektórych wyrobiskach wskazują, że prawdopodobnie miały być budowane w nich duże maszyny produkcyjne. Do budowy kompleksu wykorzystywano więźniów, w przeważającej liczbie Żydów, których rychła śmierć miała zapewnić utrzymanie tajemnicy konstrukcyjnej. Byli oni rozmieszczeni w obozach, w pobliżu miejsc pracy. Sieć tych obozów została nazwana kryptonimem Arbeitslager Riese i była częścią sieci podobozów Gross-Rosen. Nadzór nad tajemniczym projektem prowadzili górnicy z Niemiec oraz specjaliści z Włoch, Czech i Ukrainy [30]. Rozmieszczenie obiektów w kompleksie Riese i odległości między nimi przedstawia Rys. 1.

Obecnie dane literaturowe donoszą o badaniach speleomikologicznych w trzech obiektach kompleksu Riese (Osówka, Rzecznka, Włodarz), które są komercyjnie dostępne do zwiedzenia dla turystów [48, 49, 57]. Jednym z nich jest Osówka z niemieckiego Sauerhöhen, która jest drugim najbardziej zaawansowanym pod względem górniczym obiektem z kompleksu Riesen. Całkowita długość tuneli wynosi 1700 m, a kubatura 30 000 m³. Podziemia zawierają m.in. trzy sztolnie, z których najdłuższa ma około 450 metrów. Jedna z nich posiada tamy z cegły, które utrzymują wodę w tunelu [30, 57]. Obiekt Rzecznka z niemieckiego Dorfbach, potocznie zwany także lochami walimskimi, znajduje się między wioską Rzecznka i Walim. Składa się on z trzech wejść wykutych w skałach wschodniego zbocza wzniesienia Ostra, prowadzących do równoległych sztolni oddalonych od siebie o około 45 m. Między nimi usytuowane są duże hale. Długość tuneli kompleksu Rzecznka wynosi 500 m, a kubatura 14 000 m³.



Rys 1. Rozmieszczenie obiektów wchodzących w skład kompleksu Riese i odległości w metrach między nimi

Nad ziemią zbudowano główną centralę telefoniczną, której węzeł był większy niż Wrocławski czy Legnicki [30, 49]. Obiekt Włodarz z niemieckiego Wolfsburg, ma łączną długość tuneli 3 024 m, o kubaturze 42 000 m³. Ten olbrzymi kompleks został wybudowany w masywie góry Włodarz, prowadzą do niego trzy wejścia od strony północno-wschodniej i jedno od strony północnej. Całość kompleksu to duża ilość korytarzy przecinających się pod kątem prostym i tworzących siatkę. Dodatkowo istnieje w nim, jedna z największych, nieukończonych hali. Prawdopodobnie w nieosiągalnej dziś głębi obiektu zamordowano wiosną 1945 roku kilka tysięcy więźniów pracujących przy jego budowie. Około 1/3 obiektu jest zalana wodą [28, 30, 48].

3. Metody używane do oceny jakości mikrobiologicznej powietrza

Historia badań jakości biologicznej powietrza sięga początku XX wieku, kiedy wzrosło zagrożenie związane z użyciem broni mikrobiologicznej [27]. Jednakże już w starożytności Hipokrates napisał w swoim dziele *Corpus Hippocraticum*: *Gdy powietrze jest zainfekowane zanieczyszczeniami wrogimi dla rasy ludzkiej, człowiek staje się chory* [32]. Obecnie w badaniach jakości mikrobiologicznej powietrza, wykorzystuje się głównie metodę hodowlaną, choć istnieje także metoda mikroskopowa.

W metodzie mikroskopowej używa się filtry membranowe lub szkiełka powleczone substancją lepłą do wyłapania mikroorganizmów z powietrza. Jej zaletą w porównaniu do metody hodowlanej jest możliwość wykrywania w powietrzu żywych i martwych mikroorganizmów oraz trudno wzrastających na pożywkach. Dodatkowo można zaobserwować inne zanieczyszczenia biologiczne np. pyłki i roztacza. Jednakże w metodzie tej występują trudności w identyfikacji gatunkowej mikroorganizmów [27].

Metoda hodowlana polega na wyłapaniu mikroorganizmów w sposób bierny lub czynny z powietrza na szalki Petriego z podłożem hodowlanym, które następnie poddaje się inkubacji. Wyrosłe kolonie zlicza się i identyfikuje morfologicznie przy użyciu kluczy diagnostycznych lub genetycznie przez sekwencjonowanie odcinków rDNA ograniczonych np. u grzybów starterami ITS (*Internal Transcribed Spacer* / wewnętrzne sekwencje transkrybowane). Wyniki są podawane w liczbie jednostek tworzących kolonie w 1 m³ powietrza (jtk/m³) z angielskiego colony forming units (CFU/m³) [43, 56]. W metodzie tej, wykrywa się tylko komórki żywe i zdolne do aktywnego wzrostu na danej pożywce [27]. Badany materiał można pozyskiwać z powietrza w sposób bierny przez sedymentację lub czynny przez mechaniczne wyłapanie mikroorganizmów (filtracja,

zderzeniowo, odśrodkowe). W metodzie hodowlanej rodzaj zastosowanego podłoża oraz temperatura inkubacji (mikroorganizmy mają różne temperatury optymalne dla swojego wzrostu i rozwoju) wpływają na liczebność i skład gatunkowy mikroorganizmów. Podłoża Sabourauda (Sabouraud Agar, glukoza 4%, agar 2%, pepton 1%) i PDA (Potato Dextrose Agar) wykazują porównywalną przydatność do izolacji grzybów z powietrza. Natomiast pożywka Czapek-Dox Agar (1,2% agaru) jest najlepsza do izolacji grzybów drożdżkowych, w tym patogenicznych dla ludzi, a na podłożu maltozowym (Malt Extract Agar) uzyskuje się najmniejszą liczebność i skład gatunkowy grzybów [41, 42].

Metoda sedymentacyjna Kocha polega na ekspozycji szalki Petriego z podłożem przez 30 minut na wysokości 1 metra od podłogi. Następnie po inkubacji, mikroorganizmy zlicza się i identyfikuje. Do obliczenia stężenia mikroorganizmów w powietrzu wykorzystuje się założenie, że w ciągu 5 minut na powierzchni równej 1 m² osiada tyle drobnoustrojów, ile znajduje się ich w 1 m³ powietrza (w warunkach bezwietrznych i bez przeciągów) [67]. Można zastosować także wzór [37]: $X = a \times 100 \times 100 / \pi r^2 \times 0,2 \times t$, gdzie: X – ilość kolonii mikroorganizmów w 1 m³ powietrza, πr^2 – pole powierzchni szalki Petriego w cm²; 0,2 – współczynnik przeliczeniowy, uwzględniający, że w ciągu 5 minut na szalkę spadają wszystkie zarodniki z wysokości 1 m; t – czas ekspozycji w minutach. Metoda ta ze względu na samoistne osiadanie cząstek bioarezu na powierzchni pożywki posiada wiele wad. Dla wielu cząstek, nie sprawdza się założenie tej metody, ponieważ szybkość osadzania cząstek zależy od wielu czynników, takich jak: rozmiary, waga, ładunek elektrostatyczny, wilgotność, ruch powietrza np. przy użyciu tej techniki nie wykrywa się najmniejszych składników bioarezu, które osiadają bardzo wolno lub w ogóle nie ulegają sedymentacji. Metodę sedymentacyjną można stosować tylko w obiektach, gdzie nie ma ruchów powietrza, dlatego nie można jej używać np. w pomieszczeniach klimatyzowanych. Metoda ta jest prostota, szybka i mało kosztowana, ze względu na brak w niej specjalistycznych próbników powietrza. Jednakże powinno się ją stosować tylko w badaniach wstępnych [27].

W metodzie mechanicznej, czyli czynnej wykorzystuje się urządzenia pozwalające na mechaniczne oddzielenie zanieczyszczeń z pobranej próbki powietrza. Dzięki temu wzrasta dokładność badań i niweluje się wady metody sedymentacyjnej. Próbkę powietrza zawierają praktycznie wszystkie zanieczyszczenia niezależnie od ich właściwości fizykochemicznych oraz warunków panujących podczas prowadzenia pomiarów.

Metoda filtracyjna polega na przepuszczeniu próbki powietrza przez filtr, na którym zatrzymują się zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Po przeniesieniu filtra na powierzchnię pożywki w szalce Petriego, poddaje



Rys. 2. Wygląd aparatu podczas badań mikologicznych powietrza w jaskini Driny (Słowacja), próbnik ustawiono na pobór 150 litrów powietrza (fot. R. Ogórek)

się go inkubacji, a następnie zlicza wyrosłe kolonie [27]. Obecnie najczęściej stosowaną techniką jest metoda zderzeniowa z wykorzystaniem specjalnych próbników do poboru próbek powietrza – Rys. 2. Aparaty wymuszają przepływ ustawionej uprzednio objętości powietrza przez otwory w nasadkach, pod którymi znajduje się pożywka w płytce Petriego. Powietrze przepływające z dużą prędkością, uderza w powierzchnię pożywki i zmienia kierunek ruchu. Na skutek tego drobnoustroje wypadają z prądu powietrza i osiadają na powierzchni pożywki [67]. Następnie zainfekowaną pożywkę poddaje się inkubacji i zlicza się liczbę wyrosłych kolonii. Stężenie mikroorganizmów w powietrzu o (jtk/m^3 powietrza) oblicza się ze wzoru [47]: $X = (a \times 1000) / V$, gdzie: X – ilość kolonii mikroorganizmów w 1 m^3 powietrza, a – suma kolonii mikroorganizmów, które wyrosły na płytce pobranej próbki powietrza atmosferycznego, V – objętość pobranego powietrza atmosferycznego w litrach. Wadą tej metody jest możliwość zarastania pożywek w przypadku silnego zanieczyszczenia powietrza, a także spadek żywotności drobnoustrojów spowodowany stresem środowiskowym w wyniku nagłego uderzenia mikroorganizmu o pożywkę [27]. Ponadto, w tych samych warunkach środowiskowych przy użyciu kilku mierników różnych producentów można uzyskać różne stężenie drobnoustrojów w powietrzu. Jednakże różnice mogą osiągać maksymalnie 90 jtk w 1 m^3 powietrza i są istotne tylko dla obiektów słabo zanieczyszczonych przez mikroorganizmy np. pomieszczenia szpitalne itp. [31]. Zaletą metody zderzeniowej jest możliwość wykorzystania jej do kontroli powietrza na zawartość wirusów [27]. Ponadto metodą tą, szybko i prosto pobiera się próbki powietrza, co umożliwia wykonanie znacznej liczby badań w ciągu jednego dnia. Aparaty do poboru powietrza są niewielkie, co ułatwia badania wykonywane w trudnych warunkach jakie występują w obiektach podziemnych [67]. Metoda

odśrodkowa polega na nadaniu powietrzu prędkości przez wentylator odśrodkowy, na obwodzie którego znajduje się pożywka w postaci paska z podłożem wychwytyjącym zanieczyszczenia. Następnie zainfekowaną pożywkę poddaje się inkubacji i zlicza się liczbę wyrosłych kolonii [27].

Najlepszym sposobem badań speolomikologicznych jest metoda mechaniczna z wykorzystaniem techniki zderzeniowej z użyciem próbników powietrza. Dlatego, że obiekty podziemne charakteryzują się specyficznymi warunkami mikrolitycznymi (m.in. ruchy powietrza, wilgotność) oraz trudną dostępnością (m.in. wąskie strzeliwy, korytarze).

4. Czynniki środowiskowe wpływające na liczebność grzybów w obiektach podziemnych

Grzyby w obiektach podziemnych występują głównie w postaci zarodników, z powodu specyficznego mikroklimatu panującego w nich i małej dostępności składników organicznych [49, 53, 56, 57]. Rzadko spotykany jest aktywny wzrost grzybów w obiektach podziemnych. Jeżeli już występuje to głównie na martwych lub hibernujących nietoperzach, gryzoniach, stawonogach, odchodach i materii naniesionej z zewnątrz np. osady [26, 33, 38, 66].

Liczebność grzybów w powietrzu na zewnątrz obiektów podziemnych jest większa niż wewnątrz nich – Tabela I. Zarodniki grzybów nanoszone są do wnętrza obiektów podziemnych przez prądy powietrza ze środowiska zewnętrznego, stawonogi, ludzi, nietoperze, wodę i osady przedostające się szczelinami z zewnątrz [7, 26, 33, 39, 43, 48, 49, 54, 56, 57]. Jednakże, najważniejszym czynnikiem wpływającym na stężenie grzybów w obiektach podziemnych jest ich otoczenie zewnętrzne (wysokość położenia obiektu n.p.m., roślinność itp.), pora roku i obecność ruchów powietrza, które przenoszą zarodniki do wnętrza obiektu przez jego otwory np. wejściowe, wyjściowe, kominy wentylacyjne itp. [40, 44, 48, 56, 57]. Z tego powodu najwięcej grzybów z powietrza obiektów podziemnych izoluje się w tzw. strefie mroku, czyli częściach obiektów mających największy

Tabela I

Liczba jednostek tworzących kolonie grzybów w 1 m^3 powietrza, izolowanych z poszczególnych obiektów kompleksu Riese, opracowano na podstawie [48, 49, 57]

Obiekt	Na zewnątrz obiektu	Wewnątrz obiektu – wartość średnia ze wszystkich punktów pomiarowych
Osówka	347,0	114,0
Rzeczka	1332,6	586,9
Włodarz	1115,9	380,8

kontakt ze środowiskiem zewnętrznym (przy wejściach, wyjściach, kominach wentylacyjnych) [48, 49, 57].

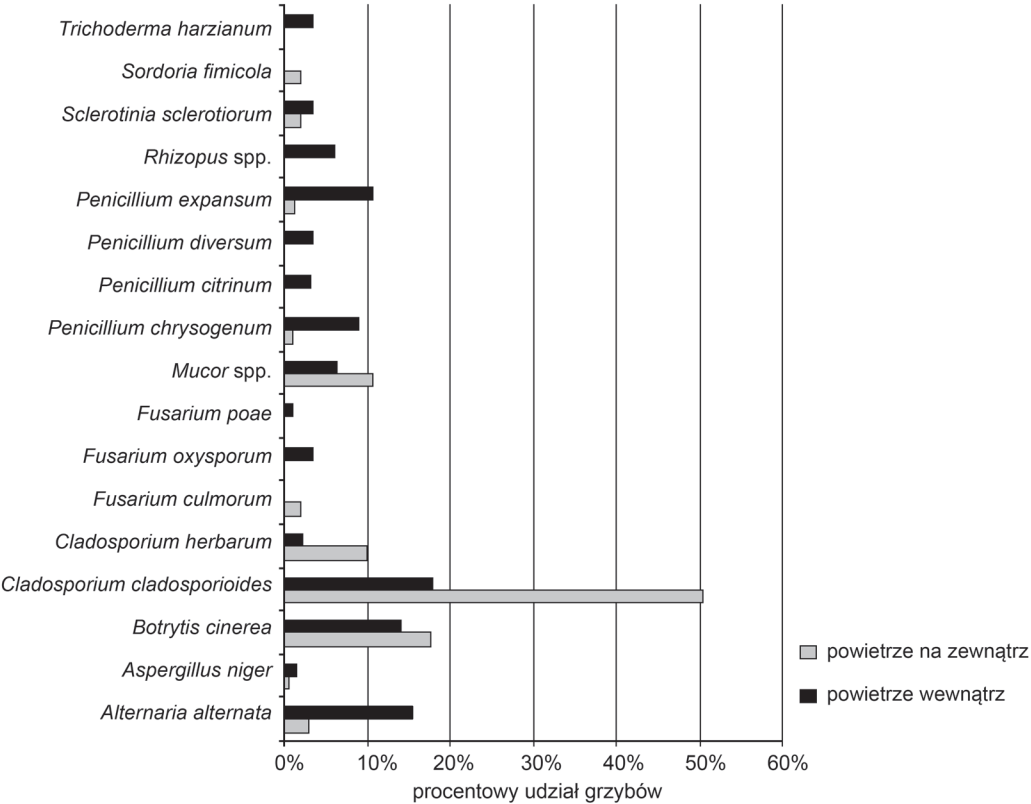
W znacznym stopniu także działalność człowieka zaburza naturalny ekosystem obiektów podziemnych. Może prowadzić do wzbogacania środowiska w materię organiczną i nieorganiczną pozostawioną przez turystów, do zmian pierwotnego mikroklimatu (wzrost temperatury, stężenia dwutlenku węgla), a także do wnoszenia nowych mikroorganizmów i zagęszczenia gleby [7, 8, 54]. W szczególności ważny jest aspekt wnoszenia nowych mikroorganizmów, ponieważ głównie są to patogenne dla ludzi i zwierząt grzyby strzępkowe i drożdżopodobne [7, 16].

5. Grzyby występujące w powietrzu wybranych obiektów kompleksu Riese

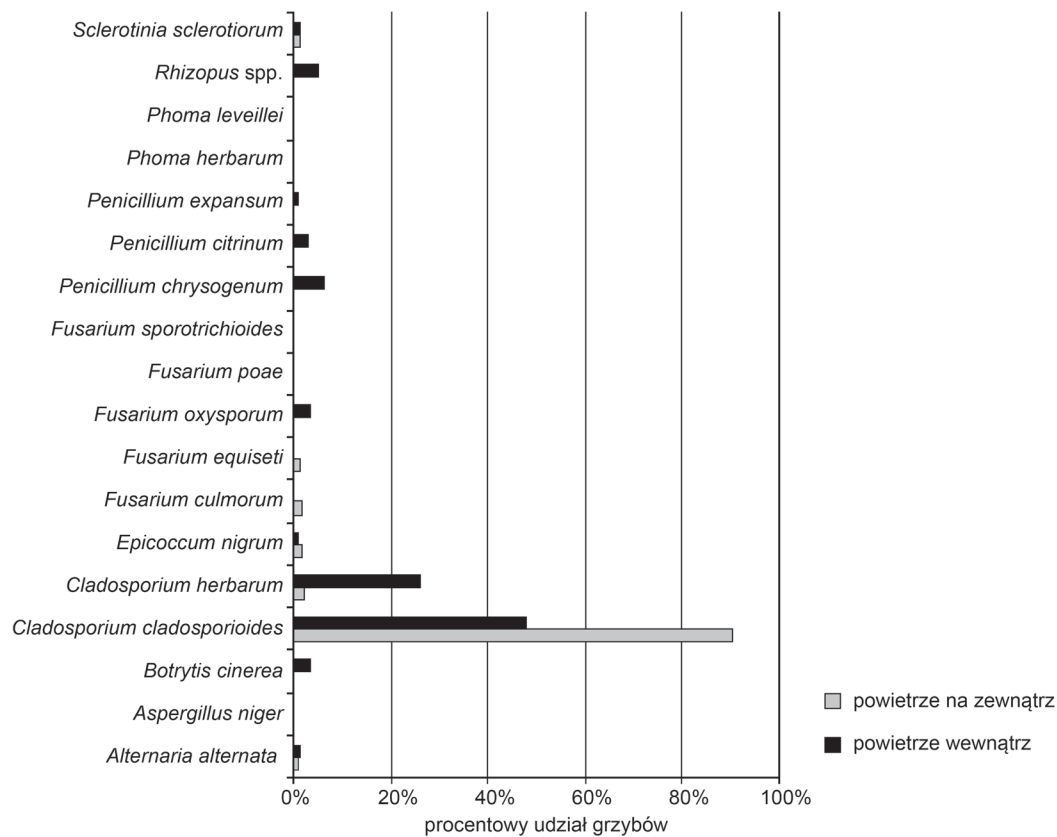
Badania spelomikologiczne w kompleksie Riese zostały przeprowadzone w okresie letnim (czerwiec, lipiec) 2013 roku przy użyciu techniki zderzeniowej z próbnikiem powietrza Air Ideal 3P i podłożem PDA [48, 49, 57]. W sumie z powietrza na zewnątrz i wewnątrz wybranych obiektów (Osówka, Rzeczką, Włodarz) wyizolowano 26 gatunków grzybów. W tym na zewnątrz obiektu Osówka i Rzeczką po 11 gatunków, Włodarz 12, a wewnątrz obiektu Osówka 14 gatunków, Rzeczką 16 i Włodarz 15 – Rys. 3, 4, 5.

Gatunki *Acremonium strictum* i *Fusarium sporotrichioides* były izolowane tylko z powietrza na zewnątrz obiektów, a *F. avenaceum*, *Penicillium diversum*, *P. waksmanii*, *Phoma herbarum*, *P. leveillei* i *Trichoderma harzianum* wyłącznie ze środka obiektów. W przypadku wszystkich obiektów z powietrza na zewnątrz izolowano gatunki: *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *C. herbarum* i *Sclerotinia sclerotiorum*, a wewnątrz obiektów: *Botrytis cinerea*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *F. oxysporum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *Rhizopus* spp. i *S. sclerotiorum*. Natomiast grzyby takie jak: *A. strictum*, *Aspergillus niger*, *Mucor* spp., *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *Rhizopus* spp., *Sordaria fimicola* i *Ulocladium alternariae* były izolowane wyłącznie z powietrza na zewnątrz wybranych obiektów, a *F. avenaceum*, *P. waksmanii*, *S. fimicola*, *T. harzianum* i *U. alternariae* tylko z powietrza wewnątrz wybranych obiektów – Rys. 3, 4, 5.

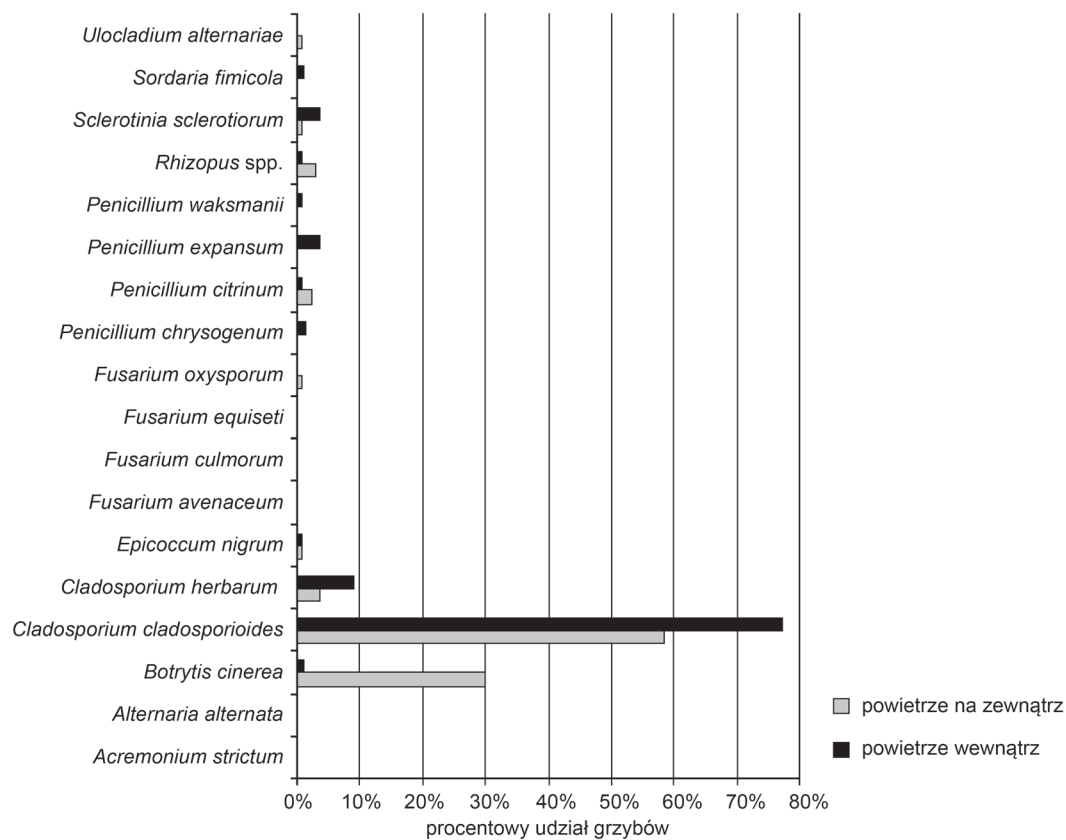
Gatunek *C. cladosporioides* był najliczniej izolowany z powietrza na zewnątrz i wewnątrz wybranych obiektów kompleksu Riese – Rys. 3, 4, 5. Grzyby z rodzaju *Cladosporium*, a w szczególności gatunki *C. cladosporioides* i *C. herbarum* (Rys. 6), dominują w atmosferze na terenie Europy [17, 45, 46, 55]. W warunkach Polskich w zależności od pory roku i rodzaju podłoża hodowanego w górach można izolować z powietrza od 50 do 85% grzybów z tego rodzaju [40]. Ważną grupą izolowaną z powietrza kompleksu Riese są grzyby



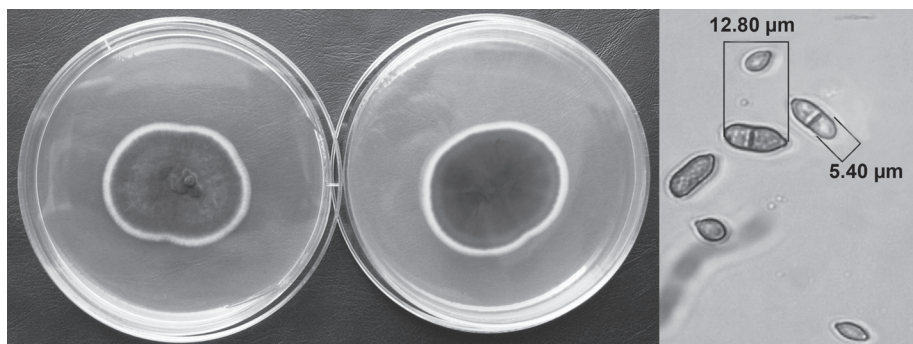
Rys. 3. Skład procentowy grzybów izolowanych z powietrza na zewnątrz i wewnątrz obiektu Osówka, opracowano na podstawie [57]



Rys. 4. Skład procentowy grzybów izolowanych z powietrza na zewnątrz i wewnątrz obiektu Rzecznica, opracowano na podstawie [49]



Rys. 5. Skład procentowy grzybów izolowanych z powietrza na zewnątrz i wewnątrz obiektu Włodarz, opracowano na podstawie [48]



Rys. 6. Hodowla *Cladosporium herbarum* w szalce Petriego z podłożem PDA i wygląd zarodników pod mikroskopem przy powiększeniu 40x (fot. R. Ogórek)

z rodzaju *Penicillium*. Są to mikroorganizmy kosmopolityczne, powszechnie występujące w powietrzu, wodzie, ziemi oraz na zwierzętach i roślinach w wielu częściach świata [24, 61].

6. Potencjalny szkodliwy wpływ grzybów wyizolowanych z powietrza wybranych obiektów kompleksu Riese na zdrowie ludzi

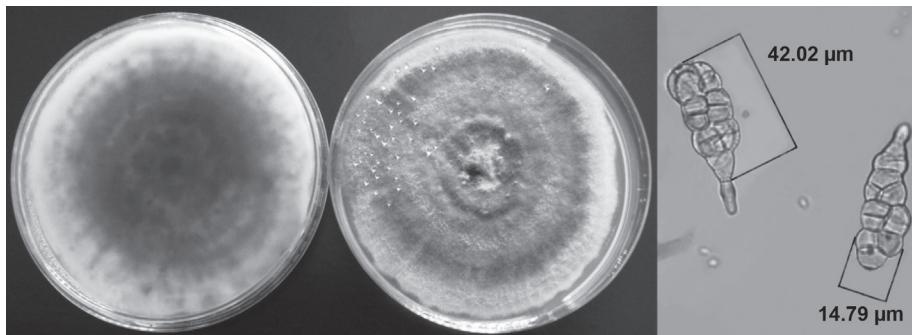
Grzyby podobnie jak inne mikroorganizmy odgrywają w ekosystemie obiektów podziemnych bardzo ważną rolę m.in. destruentów rozkładających materię organiczną [9, 34, 65]. Prawdopodobnie są także pokarmem dla organizmów żyjących w obiektach podziemnych m.in. owadów [38]. Jednakże one i ich metabolity wtórne mogą stwarzać zagrożenie dla zdrowia zwierząt i osób przybywających w obiektach podziemnych [12, 60].

Zarodniki grzybów należą do najliczniej reprezentowanych cząstek biologicznych w powietrzu atmosferycznym, swą liczebnością znacznie przewyższają liczbę ziarn pyłku obecnego w powietrzu. Najczęściej grzyby są przyczyną alergii, które powodowane są przede wszystkim przez wysiew ich zarodników i mogą objawiać się w postaci: alergii pokarmowej, alergii kontaktowej, uczulenia na antybiotyki czy też reakcji o charakterze alergicznym w przypadku istniejących w organizmie ognisk zakażenia grzybiczego [35, 59]. Objawy organizmu ze strony układu oddechowego spowodowane odpowiedzią na alergen grzybowy są znacznie silniejsze niż na inne alergeny powszechnie występujące w środowisku. Najprawdopodobniej spowodowane jest to tym, że grzyby poza alergizującymi białkami, posiadają dodatkową zdolność rozmnażania się i infekowania skóry oraz kolonizowania układu oddechowego [18]. Ponadto mogą syntetyzować różne substancje w postaci: niealergizujących toksyn i enzymów, lotnych związków organicznych oraz niebiałkowych komponentów ścian komórkowych (glukan i chityna) [10, 20, 50]. Dodatkowo mogą występować zwłaszcza u chorych na przewlekłą astmę, krzyżowe

reakcje autoimmunologiczne spowodowane wysoką homologią antygenów grzybów do niektórych ludzkich białek. Uwzględniając wszystkie wymienione mechanizmy, wysunięto hipotezę, że uszkadzające działanie grzybów w drogach oddechowych wiąże się z równoległym indukowaniem zapalenia alergicznego oraz uszkodzeniem komórek nabłonka oddechowego przez działanie niealergizujących białek i toksyn [62].

Wśród grzybów wyizolowanych z powietrza kompleksu Riese, znalazły się zarówno mikroorganizmy wywołujące ciężkie schorzenia, jak i te będące alergenami. Do pierwszej grupy zalicza się przede wszystkim grzyby z rodzajów: *Aspergillus* (aspergiloza płuc, zatok, rogówki, oczodołu, skóry, paznokci, przewodu słuchowego zewnętrznego), *Rhizopus* (mukormikoza płuc, zatok) oraz *Fusarium* (uogólniona fusarioza) [1, 2, 14, 64]. Drugą grupę stanowią patogeny będące alergenami, przynależą tu zarówno grzyby zaliczane do grupy pierwszej, jak i grzyby z rodzajów: *Alternaria*, *Acremonium*, *Cladosporium* oraz *Penicillium* [3, 51]. Ponadto, grzyby te mogą wydzielać różnego rodzaju mikotoksyny, antybiotyki i halucynogeny, które wchodzą w skład bioaerozolu. Wdychanie ich może prowadzić do zaburzeń w działaniu układu immunologicznego, neurologicznego czy też do różnego rodzaju zatruc [13].

Z dostępnych badań epidemiologicznych wynika, iż grzyby z rodzajów *Alternaria* i *Cladosporium*, a w dalszej kolejności *Penicillium* i *Aspergillus* są najczęstszą wśród alergenów grzybowych przyczyną alergii wziewnej. W dalszej kolejności należy wymienić grzyby z rodzaju *Mucor*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Pullularia*, *Curvularia*, *Phoma* i *Rhizopus* [35]. Dlatego najważniejsza dla osób uczulonych jest zawartość w powietrzu grzybów z rodzaju *Alternaria* i *Cladosporium*. W powietrzu na zewnątrz i wewnątrz wybranych obiektów kompleksu Riese dominował gatunek *C. cladosporioides*, natomiast gatunek *A. alternata* (Rys. 7) występował nielicznie. Liczbę zarodników niezbędną do wywołania objawów choroby alergicznego układu oddechowego u większości osób z nadwrażliwością na te alergeny dla populacji polskiej oceniono na 100 zarodników w 1 m³ powie-



Rys. 7. Hodowla *Alternaria alternata* w szalce Petriego z podłożem PDA i wygląd zarodników pod mikroskopem przy powiększeniu 40x (fot. R. Ogórek)

trza dla rodzaju *Alternaria* i na 2800 dla zarodników z rodzaju *Cladosporium* [58]. Przyczyną tych różnic jest najprawdopodobniej żywotność komórek i ich zdolność do uwalniania alergenów. Przypuszcza się, że około 80% konidiów *A. alternata* występujących w powietrzu to komórki żywe, a u rodzaju *Cladosporium* jedynie 20–30% [22]. Ponadto alergeny zarodników *A. alternata* uwalniane są z łatwością. Natomiast u innych gatunków np. *Aspergillus fumigatus*, wymagane jest fizyczne uszkodzenie ściany komórkowej zarodnika, a to ona decyduje o dostępności alergenu dla błony śluzowej po dostaniu się zarodnika do dróg oddechowych [35].

Obecnie nie ma żadnych norm odnośnie czystości mikrobiologicznej powietrza obiektów podziemnych. Jednakże można posłużyć się normami dla pomieszczeń mieszkalnych i użytku publicznego. Według Dutkiewicza i Mołocznika [19] stężenie grzybów do wartości 50 000 jtk w 1 m³ powietrza w pomieszczeniach zamkniętych nie wpływa na zdrowie przebywających tam ludzi. Jednakże Zespół Ekspertów ds. Czynników Biologicznych (ZECEB), Międzynarodowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy, sugeruje limit do 5000 jtk [23]. Niektóre oficjalne limity są jeszcze niższe. Według polskiej normy PN-89/Z-04111/03 powietrze nie jest zanieczyszczone grzybami, jeżeli zawiera nie więcej niż 3000 jtk w 1 m³ powietrza [52]. Natomiast Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) uważa, że koncentracja grzybów na poziomie 1500 jtk w 1 m³ powietrza jest dopuszczalna tylko wtedy, gdy jest to mieszanina gatunków [25]. Jakość mikrobiologiczna powietrza obiektów kompleksu Riese (Tabela I) nie stwarza zagrożenia dla zdrowia turystów, ponieważ nie zostały przekroczone wartości wyżej wymienionych norm.

7. Podsumowanie

Badania speleomikologiczne obiektów podziemnych pozwalają zrozumieć funkcjonowanie ich ekosystemu oraz określić ewentualne czynniki wpływające na

zaburzenia jego równowagi. Obecnie coraz więcej ludzi jest alergikami. Dlatego określenie stężenia grzybów i ich składu gatunkowego w powietrzu jest szczególnie istotne w obiektach, które otwarte są do zwiedzania dla turystów.

Najczęściej w obiektach podziemnych do oceny jakości mikrobiologicznej powietrza, wykorzystywana jest technika zderzeniowa z użyciem próbnika powietrza. Jest to jedna z metod hodowlanych, w których bardzo ważnymi aspektami są rodzaj podłoża hodowlanego i temperatura inkubacji, ponieważ one wpływają na liczebność i skład izolowanych grzybów. Standardowo stosuje się w tej metodzie podłoże PDA lub Sabourauda.

Grzyby w obiektach podziemnych występują głównie w postaci zarodników i wiele czynników wpływa na ich zawartość m.in. działalność człowieka, obecność stawonogów i nietoperzy oraz woda i osady przedstawiające się szczelinami ze środowiska zewnętrznego. Najważniejszym czynnikiem jest jednak środowisko otaczające obiekty podziemne i prądy powietrza, które przenoszą zarodniki z zewnątrz do ich środka.

Budowę kompleksu Riese rozpoczęto w roku 1943, jednakże nigdy go nie ukończono. Znajduje się on w Górach Sowich, a jego przeznaczenie do dzisiaj nie jest znane i istnieją tylko na ten temat przypuszczenia. Zwiedzanie obiektów w kompleksie Riese, zwanego także podziemnym miastem to niezwykle przeżycie, mimo jego strasznej historii powstawania. W powietrzu badanych obiektów (Osówka, Rzecznica, Włodarz), występowały grzyby, które mogą być przyczyną alergii jak i infekcji u ludzi. Jednakże stężenie ich zarodników nie przekraczało dopuszczalnych norm dla jakości mikrobiologicznej powietrza, dlatego nie stwarzają one zagrożenia dla zdrowia zwiedzających kompleks Riese ludzi.

Piśmiennictwo

1. Adamski Z., Henke K., Zawirska A., Kubisiak-Rzepczyk H.: Grzybyce narządowe (w) Mikologia – co nowego? red. E. Baran. Cornetis, Wrocław, 2008, s. 189–202

2. Adamski Z., Henke K., Zawirska A., Kubisiak-Rzepczyk H.: Grzybnice błon śluzowych (w) Mikologia – co nowego? red. E. Baran. Cornetis, Wrocław, 2008, s. 174–187
3. Adamski Z., Henke K., Zawirska A., Kubisiak-Rzepczyk H.: Rola grzybów w etiopatogenezie chorób alergicznych (w) Mikologia – co nowego? red. E. Baran. Cornetis, Wrocław, 2008, s. 30–42
4. Al-Doory Y., Rhoades E.R.: Isolation of *Histoplasma capsulatum* from a Texas cave. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **35**, 201–207 (1968)
5. An H.A., Mainelis G., Yao M.: Evaluation of a high-volume portable bioaerosol sampler in laboratory and field environments. *Indoor Air*, **14**, 385–393 (2004)
6. Balabanoff V.A.: Comparative studies of dermatophytes isolated from caves and stables in Bulgaria. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **32**, 237–248 (1967)
7. Barton H.A.: Introduction to cave microbiology: a review for the non-specialist. *J. Cave Karst. Stud.* **68**, 43–54 (2006)
8. Barton H.A., Northup D.E.: Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *J. Cave Karst. Stud.* **69**, 163–178 (2007)
9. Bastian F., Jurado V., Novakova A., Alabouvette C., Saiz-Jiménez C.: The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*, **156**, 644–652 (2010)
10. Beijer L., Thorn J., Rylander R.: Mould exposure at home related to inflammatory markers in blood. *Eur. Respir. J.* **2**, 317–322 (2003)
11. Brashear D., Wiseman R.F., Barr Jr T.C.: A psychrophilic yeast from Mammoth Cave, Kentucky. *Int. J. Speleol.* **2**, 403–404 (1967)
12. Cabral J.P.: Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. *Sci. Total. Environ.* **408**, 4285–4295 (2010)
13. Charkowska A.: Zanieczyszczenia w instalacjach klimatyzacyjnych i metody ich usuwania. IPPU MASTA, 2003, s. 1–60
14. Collado C., Medina L., Zorraquino A., Baeza T., Ferrer C., Plazas J., Francisca Colom M.: Cutaneous fusariosis by a species of the *Fusarium dimerum* species complex in a patient with acute myeloblastic leukemia. *Rev. Iberoam Micol.* **30**, 119–121 (2013)
15. Culver D.C.: Cave Life, Evolution and Ecology. Cambridge, Massachusetts and London, England: Harvard University Press, 1982, s. 189
16. Cury G.C., Filho A.D., Cruz A.G.C., Hobaika A.B.S.: Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **34** (5): 483–486 (2001)
17. D'Amato G., Spiekma F.T.H.M.: Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe. *Allergy*, **50**, 870–877 (1995)
18. Denning D.W., O'Driscoll B.R., Hogaboam C.M., Bowyer P., Niven R.M.: The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur. Resp. J.* **27**, 615–626 (2006)
19. Dutkiewicz J., Mołocznik A.: Pyły organiczne pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego. *Podst. Met. Oceny Środ. Pr.* **18**, 151–183 (1998)
20. Fogelmark B., Thorn J., Rylander R.: Inhalation of beta-D-glucan causes airway eosinophilia. *Mediators Inflamm.* **10**, 13–19 (2001)
21. Gołofit-Szymczak M., Skowron J.: Zagrożenia mikrobiologiczne w pomieszczeniach biurowych. *Bezpieczeństwo Pracy*, **3**, 29–31 (2005)
22. Govi V.: Aerial diffusion of phytopathogenic fungi. *Aerobiologia*, **8**, 84–93 (1992)
23. Górny R.L.: Aerozole biologiczne – rola normatywów higienicznych w ochronie środowiska i zdrowia. *Medycyna Środowiskowa*, **13**, 41–51 (2010)
24. Hesseltine C.W.: Genera of *Mucorales* with notes on their synonymy. *Mycologia*, **47**, 344–363 (1955)
25. Indoor Air Quality: Biological contaminants (1988) report on a WHO meeting, Rautavaara, 29 August–2 September 1988. WHO Regional Publications, European Series No. 31. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe (1988)
26. Jurado V., Laiz L., Rodriguez-Nava V., Boiron P., Hermosin B., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C.: Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *Int. J. Speleol.* **39**, 15–24 (2010)
27. Kaiser K., Wolski A.: Kontrola czystości mikrobiologicznej powietrza. *Technika Chłodnicza i Klimatyzacyjna*, **4**, 158–162 (2007)
28. Kasza D.: Możliwości wykorzystania aplikacji GIS do prac związanych z kartowaniem geologicznym na przykładzie podziemnego obiektu „Włodarz” w Górach Sowich. *Prace Naukowe Instytutu Górniczo-Politechniki Wrocławskiej*, **135**, 23–35 (2012)
29. Koilraj J.A., Marimuthu G.: Algal flora in the cave soils. *Curr. Sci.* **75**, 1111–1113 (1998)
30. Kosmaty J.: Roboty górnicze prowadzone w Górach Sowich w ramach programu „Riese” w okresie II wojny światowej. *Prace Naukowe Instytutu Górniczo-Politechniki Wrocławskiej*, **117**, 145–161 (2006)
31. Krajewska-Kułak E., Łukaszuk C., Gniadek A., Kraszyńska B., Macura A.B., Kędzior-Kornatowska K., Kornatowski T.: Porównanie wyników badań zanieczyszczenia powietrza grzybami pomieszczeń oddziału opieki długoterminowej z wykorzystaniem aparatów SAS SUPER 100 i AIR IDEAL. *Mikol. Lek.* **17**, 221–227 (2010)
32. Krajewska-Kułak E., Łukaszuk C., Gniadek A., Macura A.B., Van Damme-Ostapowicz K., Lewko J., Rolka H., Rozwadowska E., Guzowski A.: Zanieczyszczenie powietrza w pomieszczeniach mieszkalnych, ze szczególnym uwzględnieniem roli grzybów. *Mikol. Lek.* **17**, 177–181 (2010)
33. Kubátová A., Dvorák L.: Entomopathogenic fungi associated with insect hibernating in underground shelters. *Czech Mycol.*, **57**, 221–237 (2005)
34. Laiz L., Pinar G., Lubitz W., Saiz-Jimenez C.: Monitoring the colonization of monuments by bacteria: Cultivation versus molecular methods. *Environ. Microbiol.* **5**, 72–74 (2003)
35. Lipiec A.: Grzyby w etiologii chorób alergicznych. *Alergol. Współcz.* **1**, 10–14 (2002)
36. Menetrez M.Y., Foarde K.K., Dean T.R., Betancourt D.A., Moores A.: An evaluation of the protein mass of particulate matter. *Atmospheric Environ.* **4**, 8264–8274 (2007)
37. Muszyński A., Czerwińska A., Chruścińska I.: Ocena jakości powietrza wewnętrznego pod względem mikrobiologicznym w pomieszczeniach dydaktycznych Wydziału Inżynierii Środowiska PW. Problemy jakości powietrza wewnętrznego w Polsce 2005, Inst. Ogrzewnictwa i Wentylacji, Warszawa, 2005, s. 141–150
38. Nováková A.: Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. *Int. J. Speleol.* **38**, 71–82 (2009)
39. Ogórek R.: Mycological air pollutions in Gold Mine (Gertruda's Adit) in Złoty Stok. *Proceedings of the 36th Conference of Agricultural Students and Veterinary Medicine with International Participation*. Serbia, Nowy Sad, **36**, 100–107 (2012)
40. Ogórek R.: Fungi in the mountain trails of Czarna Góra Massif. Preliminary study. *Mikol. Lek.* **19**, 147–153 (2012)
41. Ogórek R., Kalinowska K., Płaskowska E., Baran E., Matkowski K.: Zanieczyszczenia powietrza grzybami na różnych podłożach hodowlanych w wybranych pomieszczeniach kliniki dermatologicznej. Część 2. *Mikol. Lek.* **18**, 83–90 (2011)
42. Ogórek R., Kalinowska K., Płaskowska E., Baran E., Moszczyńska E.: Zanieczyszczenia powietrza grzybami na różnych podłożach hodowlanych w wybranych pomieszczeniach kliniki dermatologicznej. Część 1. *Mikol. Lek.* **18**, 30–38 (2011)
43. Ogórek R., Lejman A., Matkowski K.: The fungi isolated from the Niedźwiedzia Cave in Kletno (Lower Silesia, Poland). *Int. J. Speleol.* **42**, 161–166 (2013)

44. Ogórek R., Lejman A., Matkowski K.: Influence of the external environment on airborne fungi isolated from a cave. *PJoES*, **23**, 435–440 (2014)
45. Ogórek R., Lejman A., Płaskowska E., Bartnicki M.: Fungi in the mountain trails of Śnieżnik Massif. *Mikol. Lek.* **19**, 57–62 (2012)
46. Ogórek R., Lejman A., Pusz W., Miłuch A., Miodyńska P.: Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikol. Lek.* **19**, 80–85 (2012)
47. Ogórek R., Płaskowska E.: Analiza mikologiczna powietrza wybranych pomieszczeń użytku publicznego. Doniesienie wstępne. *Mikol. Lek.* **18**, 24–29 (2011)
48. Ogórek R., Pusz W., Lejman A., Uklańska-Pusz C.: Microclimate effects on number and distribution of fungi in the underground complex in the Owl mountains (Góry Sowie), Poland. *J. Cave Karst. Stud.* **76**, 146–153 (2014)
49. Ogórek R., Pusz W., Matkowski K., Płaskowska E.: Assessment of abundance and species composition of filamentous fungi in the underground Rzecznica complex in Sowie Mountains (Lower Silesia, Poland). *Geomicrob. J.* **10**, 900–906 (2014)
50. Papuas G.P., Herbert R.J., Henderson W.: The respiratory effects of volatile organic compounds. *Int. J. Occup. Environ. Health*, **6**, 1–8 (2000)
51. Plomer-Niezgoda E., Baran E., Maj J., Czarnecka A., Hryniewicz-Gwóźdź A.: Patogenność grzybów z rodzaju *Alternaria*, *Cladosporium* i *Chrysosporium*. *Mikol. Lek.* **5**, 187–190 (1998)
52. PN-89 Z-04111/03. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów w powietrzu atmosferycznym przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną (1989)
53. Poulson T.L., White W.B.: The cave environment. *Science*, **165**, 971–981 (1969)
54. Pulido-Bosch A.: Human impact in a tourist karstic cave (Araucena, Spain). *Environmental Geology*, **31**, 142–149 (1997)
55. Pusz W., Kita W., Dancewicz A., Weber R.: Airborne fungal spores of subalpine zone of the Karkonosze and Izerskie Mountains (Poland). *J. Mt. Sci.* **10**, 940–952 (2013)
56. Pusz W., Ogórek R., Knapik R., Kozak B., Bujak H.: The occurrence of fungi in the recently discovered Jarkowicka cave in the Karkonosze Mts. (Poland). *Geomicrob. J.* **32**, 59–67 (2015)
57. Pusz W., Ogórek R., Uklańska-Pusz C., Zagożdżon P.: Speleomycological research in underground Osówka complex in Sowie Mountains (Lower Silesia, Poland). *Int. J. Speleol.* **43**, 27–34 (2014)
58. Rapiętko P., Lipiec A., Modrzyński M.: Threshold pollen concentration necessary to evoke allergic symptoms. *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol.* **10**, 91–94 (2004)
59. Rokugo M., Tagami H., Usuba Y., Tomita Y.: Contact sensitivity to pityrosporum ovale in patients with atopic dermatitis. *Arch. Dermatol.* **126**, 627–632 (1990)
60. Rusca S., Charrière N., Droz P.O., Oppliger A.: Effects of bio-aerosol exposure on work-related symptoms among Swiss saw-mill workers. *IAOEH*, **81**, 415–421 (2008)
61. Samson R.A., Yilmaz N., Houbraeken J., Spierenburg H., Seifert K.A., Peterson S.W., Varga J., Frisvad J.C.: Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud. Mycol.* **70**, 159–183 (2011)
62. Semik-Orzech A., Barczyk A., Pierzchała W.: Wpływ występowania nadwrażliwości na alergeny grzybów na rozwój i przebieg chorób alergicznych układu oddechowego. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **1**, 29–36 (2008)
63. Srikanth P., Sudharsanam S., Steinberg R.: Bio-aerosols in Indoor Environment: composition, health effects and analysis. *Indian J. Med. Microbiol.* **26**, 302–312 (2008)
64. Stevens D.A., Kann V.L., Judson M.A., Morrison V.A., Dummer S., Denning D.W., Bennett J.E., Walsh T.J., Patterson T.F., Pankey G.A.: Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 696–709 (2000)
65. Sustr V., Elhottova D., Kristufek V., Lukesova A., Novakova A., Tajovsky K., Triska J.: Ecophysiology of the cave isopod *Mesoniscus graniger* (Frivaldszky 1865) (Crustacea: Isopoda). *Eur. J. Soil Biol.* **41**, 69–75 (2005)
66. Voyron S., Lazzari A., Riccucci M., Calvanna M., Varese G.C.: First mycological investigation on Italian bats. *Hystrix It. J. Mamm.* **22**, 189–197 (2011)
67. Wiejak A.: Ocena stopnia skażenia powietrza zarodnikami grzybów pleśniowych jako czynnik ekspertyzy mikologicznej. *Prace Instytutu Techniki Budowlanej*, **3**, 3–12 (2011)
68. Żelaźniewicz A.: Tektoniczna i metamorficzna ewolucja Gór Sowich. *ASGP*, **57**, 203–348 (1987)

Wioletta Kmiecik^{1*}, Eligia M. Szewczyk¹

¹ Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wpłynęło w styczniu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 2. Taksonomia. 3. Chorobotwórczość *S. intermedius* i *S. pseudintermedius*. 4. Cytolizyny gronkowców. 4.1. Hemolizyna α . 4.2. Hemolizyna β . 4.3. Hemolizyna δ . 4.4. Hemoliza synergistyczna. 4.5. Hemolizyna γ . 4.6. Leukocydyny. 5. Podsumowanie

Cytolysins – virulence factors of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus pseudintermedius*

Abstract: Bacteria in the *Staphylococcus* genus are one of the most abundant in the human microbiome. In addition to *S. aureus*, coagulase-positive group includes other species, such as isolated from animals *S. intermedius* and *S. pseudintermedius*. Recently, these two species have been also isolated from clinical materials from humans with increasing frequency. Apart from wound infections caused by animal bites, *S. intermedius* and *S. pseudintermedius* are also an etiological agent of endocarditis, central nervous system infections or bacteremia. Both species produce cytolysins: hemolysins α , β , δ , γ and leukocidins which have the ability to damage not only erythrocytes, but also many eukaryotic cells. Thus, these toxins seem to be very important virulence factors. In the light of the recent studies indicating participation of cytolysins in inflammatory processes and formation of biofilms, toxins produced by these species seem to be of particular importance in the pathogenesis of infections.

1. Introduction. 2. Taxonomy. 3. Pathogenicity of *S. intermedius* and *S. pseudintermedius*. 4. Staphylococcal cytolysins. 4.1. Hemolysin α . 4.2. Hemolysin β . 4.3. Hemolysin δ . 4.4. Synergistic hemolysis. 4.5. Hemolysin γ . 4.6. Leukocidins. 5. Summary

Słowa kluczowe: cytolizyny, hemolizyny, gronkowce koagulazododatnie, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*

Key words: cytolysins, hemolysins, coagulase-positive staphylococci, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*

1. Wprowadzenie

Należący do rodziny *Staphylococcaceae* rodzaj *Staphylococcus* obejmuje kilkadziesiąt gatunków, z których blisko połowa związana jest z człowiekiem. Gronkowce są jednym z najliczniejszych rodzajów bakterii tworzących mikrobiom człowieka. Interakcje między organizmem gospodarza a bakteriami tego rodzaju mają bardzo zróżnicowany charakter – od komensalizmu poprzez infekcje miejscowe, aż do ciężkich zakażeń o charakterze ogólnoustrojowym. Dla celów diagnostycznych najpowszechniej stosowany jest ich podział na koagulazododatnie (CPS – Coagulase Positive Staphylococci) i koagulazoujemne (CNS – Coagulase Negative Staphylococci) oparty na uznawanej za użyteczną, gdyż pozwalającą na szybką identyfikację *S. aureus* próbie – zdolności bakterii do wytwarzania koagulazy. Jednak obok tego powszechnie znanego gatunku do grupy koagulazododatnich należą także izolowane od zwierząt lub ze środowiska: *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* czy *Staphylococcus hyicus*. W ostatnim czasie pierwsze dwa gatunki z wzrastającą częstością izolowane są także z materiałów klinicznych od ludzi [90, 93].

Zdolność hemolizowania krwinek jest cechą obserwowaną u różnych gatunków gronkowców. Wytwarzają one cytolizyny, które mają zdolność uszkodzenia jednak nie tylko erytrocytów, ale także wielu komórek eukariotycznych. Są to ważne czynniki chorobotwórczości tych bakterii. Biologiczna aktywność cytolizyn w stosunku do krwinek czerwonych stanowi najprostszy i najpowszechniej stosowany sposób ich wykrywania, a ponadto jest jedną z nielicznych cech, które są wspólne wszystkim hemolizynom.

2. Taksonomia

Gatunek *S. intermedius* po raz pierwszy został opisany w 1976 r. przez Hájka [36]. Został wyizolowany z materiału pochodzącego od różnych gatunków zwierząt (gołębi, psów, koni i norek). Swoją nazwę zawdzięcza on właściwościom biochemicznym, które Hájek określił jako cechy „pomiędzy” właściwościami charakterystycznymi dla gatunków *S. aureus* i *Staphylococcus epidermidis* – stąd w nazwie łacińskiej epitet gatunkowy „intermedius” [9]. Po tym odkryciu przez wiele lat większość koagulazododatnich szczepów gronkowców izolowanych od zwierząt, niebędących

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Pomorska 137, 90-235 Łódź; tel.: (42) 677-93-00; e-mail: wioletta.kmiecik@umed.lodz.pl

S. aureus, identyfikowano jako *S. intermedius*. Przełom nastąpił w 2005 r., kiedy to zespół belgijskich naukowców na podstawie analiz molekularnych szczepów odzwierzęcych, fenotypowo i genotypowo podobnych do *S. intermedius*, dokonał odkrycia nowego gatunku nazwanego *S. pseudintermedius* [19]. Dalsze badania molekularne szczepów wcześniej klasyfikowanych jako *S. intermedius* wykazały, że w rzeczywistości oprócz „prawdziwych” *S. intermedius*, były to również *S. pseudintermedius* i *S. delphini*. Doprowadziło to do reklasyfikacji gronkowców i utworzenia łączącej te trzy gatunki grupy SIG („*Staphylococcus intermedius* group”) [23, 69]. Zmiany w klasyfikacji podały w wątpliwość dotychczasowy opis gatunku *S. intermedius* i wszystkie opublikowane przed rokiem 2005 prace dotyczące jego cech, w których zastosowane metody identyfikacji nie różnicowały szczepów gatunków tej grupy.

3. Chorobotwórczość *S. intermedius* i *S. pseudintermedius*

Bakterie z gatunku *S. intermedius* kolonizują skórę i błony śluzowe różnych gatunków zwierząt, szczególnie psów, a także mogą stanowić u nich źródło oportunistycznych zakażeń. U ludzi gronkowiec ten jest rzadkim odzwierzęcym patogenem stanowiącym przyczynę infekcji głównie u pacjentów z obniżoną odpornością. Szczepy *S. intermedius* są jednak izolowane aż z 18% przypadków zakażonych ran spowodowanych ugryzieniami psów, ale mogą być także rzadkim czynnikiem infekcyjnym ran o innej etiologii [12]. W literaturze można znaleźć doniesienia o przypadkach wykrywania bakterii tego gatunku w materiałach od pacjentów z infekcyjnym zapaleniem wsierdza [17], zakażeniem odcewnikowym [87], zapaleniem płuc [32], zapaleniem jamy sutkowej [47], ropniem mózgu [2], ostrym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych [26], bakteriecią [38] czy nawet zatruciem pokarmowym [55]. Znane są także pojedyncze przypadki izolacji *S. intermedius* z mleka i mięsa [21, 61]. Szczepy identyfikowane jako *S. intermedius* w większości przypadków izolowano z przypadków chorób lub nosicielstwa od osób mających bliski kontakt ze zwierzętami, np. właścicieli psów [84]. Liczba infekcji wywołanych przez ten drobnoustrój stale rośnie, niemniej jednak jej rzeczywisty wymiar jest trudny do określenia. Można się spodziewać przypadków błędnej identyfikacji szczepów tego gatunku i uznawania ich za *S. aureus* ze względu na wynik próby na koagulazę oraz podobieństwo morfologiczne kolonii i komórek. Ponadto, wiele szczepów opisanych jako *S. intermedius* może być w rzeczywistości szczepami *S. pseudintermedius* [93].

Gatunek *S. pseudintermedius* został odkryty w roku 2005 i uznany za oportunistyczny patogen wywołujący

infekcje skóry i błon śluzowych psów i kotów [18]. Jednakże już w 2006 r. pojawiła się pierwsza publikacja dotycząca przypadku infekcji wywołanej przez ten drobnoustrój u człowieka [41]. Najnowsze badania wykazały szeroko rozpowszechnioną obecność *S. pseudintermedius* w weterynaryjnym środowisku szpitalnym [45, 74, 97]. Występuje też nosicielstwo tego gatunku u ludzi, które podobnie jak w przypadku *S. intermedius*, ma charakter przejściowy i w głównej mierze dotyczy osób będących w stałym kontakcie z psami [63, 64], w tym właścicieli zwierząt domowych [37], a także personelu weterynaryjnego [10]. Gronkowce *S. pseudintermedius* u ludzi stanowią dość rzadki czynnik infekcyjny. Opisywane są pojedyncze przypadki tych zakażeń: odcewnikowej bakteriemii [15], zapalenia zatok przynosowych [79], infekcyjnego zapalenia wsierdza [67], pozaszpitalnego zapalenia płuc [51] czy zakażenia rany po przeszczepie szpiku kostnego [70]. Ten ostatni przypadek, przedstawiony przez włosko-polski zespół badaczy, stanowi drugi opisany dotychczas w literaturze przypadek zgonu pacjenta wskutek infekcji *S. pseudintermedius*. Patogenne szczepy rozprzestrzeniają się klonalnie. Badania epidemiologiczne pozwoliły ustalić, że na terenie Europy szeroko rozpowszechniony jest szczep *S. pseudintermedius* ST71, natomiast w Ameryce Północnej ST68 [94].

Istotną rolę w patogeniezie infekcji wywołanych przez *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* odgrywają licznie wytwarzane przez nie czynniki wirulencji. Te, które zostały dotychczas opisane, przedstawione są w Tabeli I.

4. Cytolizyny gronkowców

Cytolizyny gronkowcowe zaliczane są do rodziny toksyn porotwórczych (PFT, pore-forming toxins) wytwarzanych przez bakterie w postaci rozpuszczalnych w wodzie białkowych monomerów konwertujących do form wbudowujących się w strukturę błon komórkowych komórek docelowych, gdzie tworzą przezbłonowe pory. Na podstawie mechanizmów tworzenia przez nie struktur transmembranowych, w obrębie rodziny toksyn PFT wyróżnia się dwie grupy: toksyny β -baryłkowe (β -barrel) i α -helikalne (α -helix) [7, 96].

Najlepiej opisanymi cytolizynami gronkowców są toksyny wytwarzane przez *S. aureus*. Stanowią one tym samym punkt odniesienia w ich poszukiwaniach i badaniach u innych gatunków. Wykrywane są cztery hemolizyny: α , β , γ i δ , zwane też α -, β -, γ - i δ -toksynami oraz leukocydyna. Najprostszym sposobem różnicowania hemolizyn jest metoda opisana już w 1973 r. oparta na wrażliwości komórek izolowanych od różnych gatunków zwierząt [48, 86, 89]. Najszerze spektrum działania na krwinki czerwone ma δ -hemolizyna,

Tabela I
Czynniki wirulencji *Staphylococcus intermedius* i *Staphylococcus pseudintermedius*

Gatunek	Czynniki chorobotwórcze	Piśmiennictwo
<i>Staphylococcus intermedius</i>	koagulaza	[57]
	enterotoksyna A	[4]
	enterotoksyna C (w tym specyficzny wariant SEC _{canine} charakterystyczny dla izolatów z piodermii)	[4]
	białko A	[30]
	β-hemolizyna	[30]
	δ-hemolizyna	[89]
	α-hemolizyna	[30]
	termonukleaza	[3, 69]
	leukotoksyna Luk-I	[58]
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	koagulaza	[28]
	α-hemolizyna	[28]
	β-hemolizyna	[28]
	δ-hemolizyna	[28]
	białko A	[14]
	proteaza	[28]
	enterotoksyny	[28]
	toksyna eksfoliatywna SIET	[28]
	leukotoksyna Luk-I	[34]

α-hemolizyna wykazuje wysoką aktywność względem erytrocytów króliczych i niską względem ludzkich, podczas gdy β-hemolizyna silnie lizuje tylko krwinki owcze. Hemolizyna γ łączy zdolność lizowania krwinek króliczych, owczych i ludzkich z cytolizą granulocytów – cechą, której nie wykazują lub wykazują w znacznie mniejszym stopniu inne hemolizyny [85]. Pod tym względem podobna jest ona do leukocydyn, których aktywność dotyczy komórek układu białokrwinkowego, ale które mogą wykazywać bardzo niską aktywność względem krwinek czerwonych, hemolizując jedynie erytrocyty królicze [65, 66].

Cytolizyny są wytwarzane przez gronkowce różnych gatunków, ale ich aktywność w dużej mierze zależy od stopnia ekspresji posiadanych genów, która jest zależna od szeregu czynników i może być różna u różnych szczepów. Warunkują one ich potencjał chorobotwórczy. Powszechnie wykorzystuje się techniki molekularne do poszukiwania kodujących je genów – w przypadku hemolizyn: *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg* i *hlg*₂, a dla leukocydyn genów: *lukS*-PV, *LukF*-PV, *lukS*-I, *LukF*-I, *lukM*, *lukED* czy *lukGH*/AB.

4.1. Hemolizyna α

Do najsilniej działających cytolizyn należy α-hemolizyna. Mechanizm jej litycznego działania oparty jest na tworzeniu otworów w strukturze błony komórki doce-

lowej. Po związaniu z jej powierzchnią monomerów toksyny i wytworzeniu przez błonowych β-baryłkowych porów, następuje ucieczka jonów K⁺ i Ca²⁺, w wyniku czego dochodzi do obumierania komórki [80]. Toksyna ta może także wywoływać agregację ludzkich trombocytów z granulocytami obojętnochołonnymi [62]. Selektywność działania α-toksyny względem komórek różnych gatunków, jak i określonych komórek związana jest z ekspresją niedawno odkrytego receptora komórkowego ADAM10 (Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing protein 10) [7]. Wiadomo, że α-hemolizyna *S. aureus* odgrywa przede wszystkim rolę w patogenezie infekcji skórnych związanych z uszkodzeniem naskórka, rzadziej natomiast w bakteriemii [88]. Wytwarzanie tej toksyny odnotowano obok *S. aureus* u licznych gatunków gronkowców koagulazoujemnych: *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, a także *Staphylococcus gallinarum* [5, 73]. W przypadku większości tych gatunków zdolność do wytwarzania α-hemolizyny jest cechą charakterystyczną tylko szczepów chorobotwórczych.

Pierwsze doniesienia dotyczące α-hemolizyny u bakterii należących do grupy SIG pochodzą z 1976 r., kiedy to Hájek stwierdził obecność tej toksyny u 11 z 50 (22%) badanych przez siebie szczepów *S. intermedius* [43].

W 2010 r. Slettemeås i wsp. [75] wykryli α -hemolizynę u zwierzęcego szczepu gronkowca należącego do grupy SIG. Jego identyfikacja była niejednoznaczna (*S. intermedius* lub *S. pseudintermedius*). U szczepów zwierzęcych wykrywany był także kodujący tę hemolizynę gen *hla* [33]. Dotychczas jednak nie wyizolowano i nie scharakteryzowano α -toksyny żadnego z gatunków należących do grupy SIG.

4.2. Hemolizyna β

Aktywność β -hemolizyny gronkowcowej zależy przede wszystkim od zawartości sfingomieliny w membranie cytoplazmatycznej wrażliwych komórek – dużej w erytrocytach, ale niższej w komórkach jądrzastych. Toksyna ta hydrolizuje sfingomielinę do ceramidów i fosforylocholino zaburzając stabilność struktury błony komórkowej [46]. Działanie to jest wzmagane po obniżeniu temperatury hodowli i określane jako efekt „hot-cold” [77].

Oprócz hemolizy erytrocytów owczych, β -hemolizyna *S. aureus* wykazuje, podobnie do α -toksyny, wybiórczą toksyczność w stosunku do monocytów, uszkadza również ludzkie limfocyty T. Walev i wsp. [91] wykazali, że już 0,001 U/ml odpowiadające około 5 ng/ml tej toksyny zabija 50% ludzkich monocytów. Wykazano istotny jej wpływ na chorobotwórczość dla zwierząt doświadczalnych [16, 39, 50]. Jak pokazali Tajima i wsp. [83], β -toksyna *S. aureus* hamuje chemotaksję i wędrówkę przez błony granulocytów obojętno-chłonnych. Działanie gronkowcowej β -toksyny polega na jej interferencji z systemem sygnałnym procesów zapalnych w komórkach śródbłonna, co znacząco wpływa na system odpornościowy organizmu gospodarza. Wynika ono z hamowania wytwarzania IL-8 przez komórki śródbłonna. Interleukina ta, indukowana działaniem TNF- α , w fizjologicznych warunkach wpływa stymulując na te procesy.

Na nową, ważną dla chorobotwórczości gronkowców cechę β -hemolizyny wskazują badania Huseby i wsp. [42]. Wykazali oni, że toksyna ta tworzy kowalencyjne wiązania z eDNA, stanowiąc ligazę DNA uwalnianego do matriks biofilmu, który tworzą patogenne szczepy tych bakterii. Powstające nierozpuszczalne polimery stabilizują biofilm *in vitro*. Ci sami badacze pokazali, że toksyna ta stymuluje wytwarzanie biofilmu *in vivo*.

Hemolizyna β jest wskazywana jako istotny czynnik chorobotwórczości wielu gatunków gronkowców koagulazoujemnych: *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* i *S. warneri*. Wykrywana była także u szczepów *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. cohnii* czy *Staphylococcus chromogenes* [5].

Hemolizyna β jest też najlepiej poznaną hemolizyną *S. intermedius*. Wczesne badania polegały na ocenie wrażliwości erytrocytów różnych gatunków na jej działanie lityczne. Już w 1976 r. w pierwszej pracy dotyczącej wówczas nowo odkrytego gatunku *S. intermedius* Hájek stwierdził, że β -hemolizyna jest wytwarzana konstytutywnie przez wszystkie trzy badane przez niego szczepy *S. intermedius* [36]. W roku 1984 Biberstein i wsp. [8] potwierdzili zdolność do wytwarzania β -toksyny wykazując ją u 126 z 200 badanych szczepów (63%). Szczepy te były zidentyfikowane jako *S. intermedius* na podstawie testów biochemicznych Staph-Ident, API. Nie jest to jednak metoda pozwalająca na odróżnienie tego gatunku od *S. pseudintermedius*. Pierwsze badania prowadzące do izolacji i oczyszczenia β -toksyny produkowanej przez *S. intermedius* przeprowadzili w 1996 r. Dziewanowska i wsp. Badacze ci porównali jej właściwości z β -hemolizyną wytwarzaną przez *S. aureus*. Toksyny izolowano równolegle z dwóch szczepów: *S. aureus* RN 4220 i *S. intermedius* 94-072594 (obecnie *S. intermedius* ATCC 29663). Analiza pokazała ich znaczne podobieństwo. Wykazano, że należą one do klasy obojętnych sfingomielinaz C, hydrolizując lizofosfatydylocholinę, ale nie wykazują aktywności wobec fosfatydylocholino, fosfatydyloetanoloaminy i fosfatydyloseryny [27]. Badania te pokazały także, że obie toksyny są monomerami o identycznych parametrach kinetycznych (stała K_m 1,4 mM, V_{max} 100 mmol/min/ μ g białka), ale różnej masie. Masę β -hemolizyny *S. intermedius* określono jako 33 500 Da, zaś toksyny izolowanej z *S. aureus* – 35 500 Da. Wykazano, że toksyny te różnią się także składem aminokwasowym oraz aktywnością enzymatyczną wobec sfingomielinazy po zadziałaniu ditiotreitołem (DTT), co wynika z braku reszty cysteinowej w strukturze β -toksyny *S. intermedius* i co wpływa również na termostabilność tego białka. Obie β -hemolizyny są stabilne w temperaturze 37°C, jednakże aktywność toksyny *S. intermedius* w wyższej temperaturze ulega szybszemu spadkowi. Różnice dotyczą też innych cech: β -hemolizyna *S. intermedius* cechuje się największą aktywnością w pH 6,0–7,5 (*S. aureus* – pH 6,5–7,5) oraz 5-krotnie silniejszym działaniem hemolitycznym wobec erytrocytów owczych w porównaniu z badaną przez tę grupę hemolizyną *S. aureus*. Również w analizie serologicznej udowodniono brak identyczności tych dwóch toksyn, ale wykazano jednocześnie, że charakteryzowały się one reaktywnością krzyżową [27].

W przypadku *S. pseudintermedius* w pierwszej publikacji dotyczącej odkrycia tego gatunku w 2005 r., Devriese i wsp. [19] stwierdzili, w oparciu o metodę fenotypową (efekt „hot-cold”), zdolność do produkcji β -hemolizyny przez wszystkie cztery badane wtedy

szczepu. Przyjmuje się, że wytwarzanie tej toksyny przez szczep *S. pseudintermedius*, podobnie jak *S. intermedius*, ma charakter konstytutywny [71].

4.3. Hemolizyna δ

Gronkowcowa δ -hemolizyna jest zaliczana do rodziny toksyn typu α modulin rozpuszczalnych w fenolu – PSM α (Phenol-Soluble Modulins α) [59]. Toksyna ta wyróżnia się spośród innych gronkowcowych hemolizyn kilkoma charakterystycznymi właściwościami. Jest amfipatycznym polipeptydem o niskiej masie cząsteczkowej i strukturze α -helisy, stosunkowo termostabilnym (pozostaje stabilna w temperaturze 80°C przez 15 minut), rozpuszczalnym w mieszaninie chloroformu i metanolu. Jej aktywność jest hamowana przez fosfolipidy, niektóre kwasy tłuszczowe, surowicę oraz frakcje α - i β -globulin surowicy [76].

Ekspresja toksyny zależy od gęstości populacji komórek i jest regulowana przez system regulacyjny *agr* za pośrednictwem peptydu autoinduktora AgrD. Toksyna w hodowli wydzielana jest dopiero w późnej fazie logarytmicznego wzrostu [89].

Wskazuje się na dwa, zależne od stężenia, scenariusze działania tej toksyny na błony. W niskich stężeniach, poniżej stężenia granicznego, toksyna agreguje przylegając do powierzchni i zaburzając jej dwuwarstwową formę, aby przy już niewielkim wzroście stężenia utworzyć kanały: małe w formie oktamery lub duże zbudowane z oligomerów. Powyżej stężenia granicznego, w wysokich stężeniach toksyna działa na membranę cytoplazmatyczną jak surfaktant, niszcząc jej dwuwarstwową strukturę i w konsekwencji prowadząc do natychmiastowej lizy komórki [89].

Hemolizyna δ wykazuje niespecyficzną gatunkowo aktywność hemolityczną [76], dlatego może prowadzić do lizy erytrocytów wielu różnych gatunków, ale także organelli komórkowych, a nawet protoplastów i sferoplastów bakterii [48]. Toksyna ta, podobnie do innych PSMs, wykazuje również niską aktywność lityczną w stosunku do granulocytów obojętnochłonnych, a także może stanowić dla nich czynnik chemotaktyczny [49]. Zdolność do wytwarzania δ -hemolizyny jest cechą powszechną nie tylko wśród gronkowców koagulazododatnich, ale także koagulazoujemnych, u których dotyczy nawet do 80% szczepów [22], głównie z gatunków *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warnerii* i *S. lugdunensis*, a także w mniejszym stopniu u *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus* oraz *S. xylophilus* [11, 40, 73].

Toksyna δ jest także konstytutywnie wytwarzana przez *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* [51, 89]. U *S. intermedius*, podobnie do *S. aureus*, kodowana jest przez gen *hld* stanowiący strukturalny element częs-

teczki RNAlII (transkrypt P3) systemu regulacyjnego *agr*, a jej wytwarzanie, podobnie jak u *S. aureus*, zależy od gęstości komórek bakteryjnych [44, 82].

4.4. Hemoliza synergistyczna

Gronkowcowa δ -hemolizyna nazywana jest także hemolizyną synergistyczną z powodu oddziaływania, jakie wywiera ona na częściowo zhemizowane przez β -hemolizynę, bogate w sfingomielinę krwinki baranie. Działanie to nazywamy ko-hemizacją lub hemolizą synergistyczną i polega ono na wzmożonej lizie tych erytrocytów wskutek współdziałania niniejszej toksyny oraz wytwarzanych przez różne gatunki bakterii innych czynników ich wirulencji: toksyn i enzymów. Zjawisko to stało się podstawą dla wykorzystywanego powszechnie w diagnostyce testu CAMP nazwanego tak przez Murphy i wsp. [52] na cześć jego odkrywców (Christie R., Atkins N.E. i Munch-Petersen E., stąd eponim CAMP). W teście tym autorzy zaproponowali wykorzystywanie referencyjnego szczepu *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 lub NCTC 1803) jako stanowiącego odniesienie producenta β -hemolizyny. Test CAMP to ważna, prosta do wykonania próba wykorzystywana w identyfikacji paciorkowców grupy B (GBS) i *Listeria monocytogenes*, dwóch drobnoustrojów o istotnym znaczeniu klinicznym, poszukiwanych powszechnie w profilaktyce okołoporodowej, a także *Actinomyces neuii*, *Corynebacterium striatum* czy *Turicella otitidis* i innych bakterii, które mają zdolność wytwarzania tzw. czynników CAMP. Stanowią je na przykład: cytotoksyna Cfb wytwarzana przez *Streptococcus agalactiae* [56], fosfolipaza C *Listeria monocytogenes*, toksyny Apx *Actinobacillus pleuropneumoniae* i RTX *Pasteurella aerogenes*, oksydaza cholesterolu *Rhodococcus equi*, endopeptydaza O-sialoglikoproteiny *Riemerella anatipestifer* oraz kohemizyna Cfa wytwarzana przez *Bartonella henselae* [53], a przypadku różnych gatunków gronkowców δ -hemolizyna (także u *S. intermedius*) [13, 20, 68, 89].

Ze względu na zdolność do konstytutywnej produkcji β -hemolizyny przez wszystkie szczepy *S. pseudintermedius* Savini i wsp. [72] zaproponowali wykorzystywanie tego gatunku jako alternatywnego do diagnostycznego testu CAMP zamiast używanych obecnie referencyjnych szczepów *S. aureus*.

4.5. Hemolizyna γ

Gronkowcowa γ -hemolizyna, podobnie jak α -hemolizyna, należy do grupy toksyn PFT (Pore Forming Toxins), których mechanizm działania oparty jest na tworzeniu β -cyldrycznych otworów w błonach

komórkowych komórek docelowych. Zbudowana jest ona z dwóch oddziałujących synergistycznie polipeptydowych składowych – komponenty S (slow) w postaci HlgA lub HlgC i komponenty F (fast) – HlgB. Ich nazwy (S i F) wywodzą się od szybkości ich migracji podczas rozdzielu elektroforetycznego [35, 58]. Hemolizyna γ charakteryzuje się znacznym działaniem cytolitycznym wobec erytrocytów króliczych, ludzkich i owczych [85], a także ludzkich granulocytów obojętnochłonnych. To ostatnie jest szczególnie silne i może wynikać z obecności niescharakteryzowanego jeszcze dotąd receptora na ich powierzchni [31]. Hemolizyna ta zaliczana jest niekiedy do gronkowcowych leukocydyn i określana jako HlgACB. Uważa się, że ma ona pewne znaczenie w przebiegu zakażeń wieloopornymi szczepami CA-MRSA (community-acquired methicillin-resistant *S. aureus*) [1].

Pośród wszystkich hemolizyn produkowanych przez bakterie z grupy SIG, to właśnie γ -hemolizyna jest toksyną stosunkowo najmniej poznaną. Przez wiele lat uważano, że szczepy zarówno *S. intermedius*, jak i *S. pseudintermedius* jej nie wytwarzają [55]. Przełomem okazały się jednak badania Gharsa i wsp. z 2013 r. [33], w których u 38,2% poddanych genetycznej analizie 30 szczepów *S. pseudintermedius* wykazano obecność genu *hlg_γ*, kodującego jedną z komponent γ -toksyny gronkowcowej. W roku 2002 Nishiyama i wsp. [58], opisując leukotoksynę Luk-I wytwarzaną powszechnie przez szczepy *S. intermedius*, zwrócili uwagę na fakt znacznego jej podobieństwa do γ -hemolizyny gronkowców, gdyż komponenta Hlg1 hemolizyny jest identyczna ze składową LukF leukotoksyny, zaś komponenty Hlg2 i LukS wykazują 80% identyczności aminokwasowej sekwencji.

4.6. Leukocydyny

Gronkowce mogą wytwarzać trzy leukocydyny, z których najlepiej poznana jest wysoce specyficzna gatunkowo dla *S. aureus* leukocydyna Panton-Valentine – PVL. Jest ona, podobnie jak pozostałe dotąd opisane, toksyną dwuskładnikową złożoną ze składowych F i S o masach molekularnych 38 kDa (LukF-PV) i 32 kDa (LukS-PV) [66]. Toksyna ta uważana jest za istotny czynnik chorobotwórczości tych bakterii [54]. Dwie nowo opisane leukocydyny to leukocydyna LukAB/HG i Luk-ED, obie odgrywające rolę w przeżywaniu gronkowców we krwi ludzkiej, pierwsza uznana za kluczową dla chorobotwórczości szczepów CA-MRSA [24, 25]. Opisana została także leukocydyna LukM (zwana także LukM/F'-PV) mająca znaczenie w patogenezie gronkowcowego zapalenia gruczołów mlecznych. Wykazuje ona niską aktywność w stosunku do ludzkich granulocytów obojętnochłonnych, ale jest silnie

leukotoksyczna wobec krwinek przeżuwaczy [29, 60]. Benito i wsp. w 2013 r. stwierdzili obecność genów ją kodujących u jednego szczepu ludzkiego [6].

Wykryta i zsekwencjonowana już w 1995 r. przez Prevost i wsp. [65], wytwarzana przez *S. intermedius* leukotoksyna Luk-I, obok wytwarzanych przez *S. aureus* leukocydyn Panton-Valentine (PVL), leukocydyny Luk-M i γ -hemolizyny, należy do toksyn synergohymentroficznych (SHT), które są kodowane w postaci operonu złożonego z dwóch składowych, w przypadku Luk-I: genów *lukS-I* i *lukF-I*, wspólnie transkrybowanych. Kodowane przez nie współdziałające synergistycznie białka LukS-I i LukF-I mają masę odpowiednio 32 kDa i 33 kDa. Podobnie do toksyn wytwarzanych przez *S. aureus*, wykazują one działanie w stosunku do granulocytów, w tym ludzkich i niewysoką aktywność hemolityczną wobec erytrocytów króliczych [58]. W późniejszych badaniach znaleziono leukocydynę Luk-I także u szczepów *S. pseudintermedius* pochodzenia zwierzęcego, jak również innego przedstawiciela grupy SIG – *S. delphini* izolowanych w tych badaniach od osłów. U tych ostatnich wykrywano jednak tylko gen *lukF-I* i nie wykazano aktywności leukotoksycznej [34].

W roku 2011 Soedarmanto i wsp. [78], wykonali analizę genetyczną szczepu *S. pseudintermedius* izolowanego od człowieka, u którego wykazali obecność genów *lukS-I* i *lukF-I*. Jest to, jak dotąd, jedyne doniesienie o wyposażeniu w leukocydynę Luk-I szczepów tego gatunku izolowanych od ludzi.

* * *

Badania genetyczne, wykrywanie genów cytolizyn, a także obserwacja ich ekspresji i regulacji produkcji stanowi dodatkową, coraz powszechniej stosowaną strategię w pracach nad tymi toksynami. Pozwalają one także śledzić wysoce prawdopodobny transfer międzygatunkowy. Geny niektórych cytolizyn uzyskiwane są przez komórki gronkowców na drodze transdukcji, co sprzyja ich dalszemu horyzontalnemu rozprzestrzenianiu. Lizogenne fagi są na przykład przenosicielami genów leukocydyn [95]. Van Wamel i wsp. [92] opisali zdolność uszkodzenia przez fagi genu β -hemolizyny, który jest ich receptorem i włączanie w to miejsce genów istotnych w procesie zaburzania funkcji układu odpornościowego gospodarza.

Ekspresja genów kodujących cytolizyny w komórkach podlega procesom regulacyjnym. Jednym z systemów warunkujących zdolność bakterii z gatunku *S. intermedius* do odbioru sygnałów środowiskowych oraz mających bezpośredni związek z kontrolą aktywności genów kodujących czynniki chorobotwórczości, w tym cytolizyn, jest już dobrze poznany system *agr* (accessory gene regulator) należący do dwuskładnikowych systemów przekazywania sygnału (Two-Component

Signal Transduction Systems – TCSTS) [81, 82]. Badania dotyczące regulacji wydzielania między innymi δ -hemolizyny i leukotoksyny przeprowadzili Sung i wsp. [81]. Stwierdzili oni, że u *S. intermedius* system ten składa się z fragmentu DNA o wielkości 3436 par zasad (pz) z kodującego dwa transkrypty – RNAII i RNAIII. Koniec 5' cząsteczki RNAIII *S. intermedius* pełni funkcję aktywatora ekspresji genów, a także wykazuje na odcinku między 10 a 35 nukleotydem sekwencji wysoki stopień podobieństwa u wszystkich gatunków gronkowców. Wskazuje to na ich istotną i uniwersalną rolę w regulacji ekspresji genów za pomocą podobnych mechanizmów sterowania. Cząsteczka RNAIII *S. intermedius* zawiera w swej strukturze otwartą ramkę odczytu kodującą homolog δ -hemolizyny gronkowców, która jest kodowana przez gen *hld*. Większość genów δ -lizyny różnych gatunków gronkowców zlokalizowana jest we fragmencie 5' RNAIII, jednakże u *S. intermedius* w strukturze genu powyżej otwartej ramki odczytu dodatkowo znajduje się sekwencja insercyjna. Mimo tej różnicy otwarta ramka odczytu δ -hemolizyny *S. intermedius* wykazuje znaczny stopień podobieństwa sekwencji w stosunku do *S. aureus* (16 z 25 aminokwasów δ -lizyny *S. intermedius* jest identycznych z *S. aureus*) oraz różnych gatunków gronkowców koagulazoujemnych. Z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że δ -hemolizyna produkowana przez szczepy *S. intermedius* może cechować się podobnym do δ -toksyny *S. aureus* mechanizmem działania. Region 3' cząsteczki RNAIII u *S. aureus* jest odpowiedzialny za wytwarzanie α - i β -hemolizyny, a wysoki stopień konserwatywności sekwencji w tym regionie u różnych gatunków gronkowców, a tym samym u *S. intermedius*, może sugerować podobieństwo funkcjonalne do *S. aureus*. [81]. Badania te, wykonane w 2005 r. zostały przeprowadzone na bliżej nieokreślonej przez autorów kolekcji 20 szczepów izolowanych ze skóry psów z zapaleniem skóry, a pochodzących z kolekcji Royal Veterinary College w Londynie. Można tylko domniemywać, że wszystkie one rzeczywiście należały do gatunku *S. intermedius*, a nie *S. pseudintermedius*.

5. Podsumowanie

Wiedza na temat cytolizyn wytwarzanych przez gronkowce z gatunków *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* jest niepełna. Wyodrębnienie nowego, pokrewnego, a jednak odrębnego gatunku po prawie 30 latach od opisanie *S. intermedius* stawia dodatkowo pod znakiem zapytania wyniki przeprowadzonych w tym okresie badań. Jednocześnie izolacja tych gatunków z materiałów klinicznych od ludzi uzasadnia coraz szersze nimi zainteresowanie. W świetle wyników najnowszych badań wskazujących na ich udział obok dzia-

łania cytolitycznego w przebiegu procesów zapalnych czy tworzeniu biofilmów, cytolizyny wydają się mieć, spośród czynników potencjalnie ważnych dla chorobotwórczości tych gatunków, szczególne znaczenie.

Piśmiennictwo

1. Alonzo F., Benson M.A., Chen J., Novick R.P., Shopsin B., Torres V.J.: *Staphylococcus aureus* leucocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo. *Mol. Microbiol.* **83**, 423–435 (2012)
2. Atalay B., Ergin F., Cekinmez M., Caner H., Altinors N.: Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius*. *Acta Neurochir.* **147**, 347–348; discussion 348 (2005)
3. Becker K., von Eiff C., Keller B., Brück M., Etienne J., Peters G.: Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **51**, 237–244 (2005)
4. Becker K., Keller B., Eiff C.V.O.N., Bru M., Lubritz G., Etienne J., Peters G.: Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5551–5557 (2001)
5. Bedidi-Madani N., Greenland T., Richard Y.: Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. *Vet. Microbiol.* **59**, 139–145 (1998)
6. Benito D., Lozano C., Gómez-Sanz E., Zarazaga M., Torres C.: Detection of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 strains in gut microbiota of healthy humans in Spain. *Microb. Ecol.* **66**, 105–111 (2013)
7. Berube B., Wardenburg J.: *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins*, **5**, 1140–1166 (2013)
8. Biberstein E.L., Jang S.S., Hirsh D.C.: Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 610–615 (2000)
9. Bond R., Loeffler A.: What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small Anim. Pract.* **53**, 147–154 (2012)
10. Boost M. V., So S.Y.C., Perreten V.: Low rate of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococcal colonization of veterinary personnel in Hong Kong. *Zoonoses Public Health*. **58**, 36–40 (2011)
11. Butt H.L., Dunstan R.H., Mcgregor N.R., Roberts T.K.: An association of membrane-damaging toxins from coagulase-negative staphylococci and chronic orofacial muscle pain. *J. Med. Microbiol.* **47**, 577–584 (1998)
12. Campanile F., Bongiorno D., Borbone S., Venditti M., Giannella M., Franchi C., Stefani S.: Characterization of a variant of the SCCmec element in a bloodstream isolate of *Staphylococcus intermedius*. *Microb. Drug Resist.* **13**, 7–10 (2007)
13. Cheunga G.Y., Duong A.C., Ottoa M.: Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect.* **14**, 380–386 (2013)
14. Chrobak D., Kizerwetter-Świda M., Rzewuska M., Moodley A., Guardabassi L., Binek M.: Molecular characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from clinical samples of animal origin. *Folia Microbiol.* **56**, 415–422 (2011)
15. Chuang C.-Y., Yang Y.-L., Hsueh P.-R., Lee P.-I.: Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1497–1498 (2010)
16. Collins J., Buckling A., Massey R.C.: Identification of factors contributing to T-cell toxicity of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2112–2114 (2008)

17. DelPace S., Savino A., Rasoini R., Alderighi C., Acquafresca M., Innocenti A.A., Pratesi C., Gensini G.F.: A 72-year-old man with intermittent fever, anemia and a history of coronary and peripheral artery disease. *Intern. Emerg. Med.* **5**, 415–420 (2010)
18. Descloux S., Rossano A., Perreten V.: Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1818–1823 (2008)
19. Devriese L.A., F. Haesebrouck i wsp.: *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1569–1573 (2005)
20. Donvito B., Etienne J., Denoroy L., Greenland T., Benito Y., Vandenesch F.: Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. *Infect. Immun.* **65**, 95–100 (1997)
21. Doyle M.E., Hartmann F.A., Lee Wong A.C.: Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Anim. Health Res. Rev.* **13**, 157–180 (2012)
22. Dudkiewicz B., Mikucki J.: Gronkowce koagulazoujemne izolowane z przypadków infekcyjnego zapalenia wsierdza. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **48**, 103–110 (1996)
23. Van Duijkeren E., K. Törneke i wsp.: Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2705–2714 (2011)
24. DuMont A.L., Nygaard T.K., Watkins R.L., Smith A., Kozhaya L., Kreiswirth B.N., Shopsin B., Unutmaz D., Voyich J.M., Torres V.J.: Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **79**, 814–825 (2012)
25. DuMont A.L., Yoong P., Surewaard B.G.J., Benson M.A., Nijland R., van Strijp J.A.G., Torres V.J.: *Staphylococcus aureus* elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human neutrophils. *Infect. Immun.* **81**, 1830–1841 (2013)
26. Durdik P., Fedor M., Jesenak M., Hamzikova J., Knotkova H., Banovcin P.: *Staphylococcus intermedius*—rare pathogen of acute meningitis. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, 236–238 (2010)
27. Dziewanowska K., Edwards V.M., Deringer J.R., Bohach G.A., Guerra D.J.: Comparison of the beta-toxins from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**, 102–108 (1996)
28. Foster T.J.: Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet. Dermatol.* **20**, 456–470 (2009)
29. Fromageau A., Gilbert F.B., Prevost G., Rainard P.: Binding of the *Staphylococcus aureus* leucotoxin LukM to its leucocyte targets. *Microb. Pathog.* **49**, 354–362 (2010)
30. Futagawa-Saito K., Ba-Thein W., Sakurai N., Fukuyasu T.: Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *BMC Vet. Res.* **2**, 4 (2006)
31. Gauduchon R.I.E., Werner S., Pre G., Colin D.A.: Flow cytometric determination of Panton-Valentine leukocidin S component binding. *Infect. Immun.* **69**, 2390–2395 (2001)
32. Gerstätt K., Daly J.S., Mitchell M., Wessolossky M., Cheeseman S.H.: Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 218–219 (1999)
33. Gharsa H., Ben Slama K., Gómez-Sanz E., Lozano C., Klibi N., Jouini A., Messadi L., Boudabous A., Torres C.: Antimicrobial resistance, virulence genes, and genetic lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in Tunisia. *Microb. Ecol.* **66**, 363–368 (2013)
34. Gharsa H., Slama K.B., Gómez-Sanz E., Gómez P., Klibi N., Zarazaga M., Boudabous A., Torres C.: Characterisation of nasal *Staphylococcus delphini* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy donkeys in Tunisia. *Equine Vet. J.* DOI: 10.1111/evj.12305 (2014)
35. Guillet V., Roblin P., Werner S., Coraiola M., Menestrina G., Monteil H., Prevost G., Mourey L.: Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* **279**, 41028–41037 (2004)
36. Hajek V.: *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 401–408 (1976)
37. Hanselman B.A., Kruth S.A., Rousseau J., Weese J.S.: Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Can. Vet. J.* **50**, 954–958 (2009)
38. Hatch S., Sree A., Tirrell S., Torres B., Rothman A.L.: Metastatic complications from *Staphylococcus intermedius*, a zoonotic pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1099–1101 (2012)
39. Hayashida A., Bartlett A.H., Foster T.J., Park P.W.: *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *Am. J. Pathol.* **174**, 509–518 (2009)
40. Hébert G.A.: Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2425–2431 (1990)
41. Van Hoovels L., Vankeerberghen A., Boel A., Van Vaerenbergh K., De Beenhouwer H.: First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4609–4612 (2006)
42. Huseby M.J., C.A. Earhart i wsp.: Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14407–14412 (2010)
43. Jasper D.E., Infante F., Dellinger J.D.: Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 582–584 (1985)
44. Ji G., Pei W., Zhang L., Qiu R., Lin J., Benito Y., Lina G., Novick R.P.: *Staphylococcus intermedius* produces a functional agr autoinducing peptide containing a cyclic lactone. *J. Bacteriol.* **187**, 3139–3150 (2005)
45. Julian T., Singh A., Rousseau J., Weese J.S.: Methicillin-resistant staphylococcal contamination of cellular phones of personnel in a veterinary teaching hospital. *BMC Res. Notes*, **5**, 193 (2012)
46. Katayama Y., Baba T., Sekine M., Fukuda M., Hiramatsu K.: Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **195**, 1194–1203 (2013)
47. Kikuchi K., Karasawa T., Piao C., Itoda I., Hidai H., Yamaura H., Totsuka K., Morikawa T., Takayama M.: Molecular confirmation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. *J. Infect. Chemother.* **10**, 46–48 (2004)
48. Kreger A.S., Kim K.S., Zaboretzky F., Bernheimer A.W.: Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin. *Infect. Immun.* **3**, 449–465 (1971)
49. Kretschmer D., A. Peschel i wsp.: Human formyl peptide receptor 2 (FPR2/ALX) senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe*, **7**, 463–473 (2012)
50. Kruse A.C., Huseby M.J., Shi K., Digre J., Ohlendorf D.H., Earhart C.A.: Structure of a mutant β toxin from *Staphylococcus aureus* reveals domain swapping and conformational flexibility. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 438–441 (2011)
51. Laurens C., Marouzé N., Jean-Pierre H.: [*Staphylococcus pseudintermedius* and *Pasteurella dagmatis* associated in a case of community-acquired pneumonia]. *Médecine Mal. Infect.* **42**, 129–131 (2012)
52. Lesmana M., Subekti D., Tjaniadi P., Pazzaglia G., Sugianingsih S.: Detection of synergistic hemolysis between *Vibrio cholerae* NON-01 and staphylococcal beta-lysin with modified CAMP test. *Bul. Penelit. Kesehat.* **21**, 17–21 (1993)

53. Litwin C.M., Johnson J.M.: Identification, cloning, and expression of the CAMP-like factor autotransporter gene (*cfa*) of *Bartonella henselae*. *Infect. Immun.* **73**, 4205–4213 (2005)
54. Löffler B., Hussain M., Grundmeier M., Brück M., Holzinger D., Varga G., Roth J., Kahl B.C., Proctor R.A., Peters G.: *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* **6**, 1–12 (2010)
55. Mahoudeau I., Delabranche X., Prevost G., Monteil H., Piemont Y.: Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2153–2155 (1997)
56. Merl K., Abdulmawjood A., Lämmler C., Zschöck M.: Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**, 87–92 (2003)
57. Murugaiyan J., Walther B., Stamm I., Abou-Elnaga Y., Brueggemann-Schwarze S., Vincze S., Wieler L., Lübke-Becker A., Semmler T., Roesler U.: Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-TOF MS database. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 1007–1015 (2014)
58. Nishiyama A., Antonette M., Guerra R. V., Sugawara N., Yokota K., Kaneko J., Kamio Y.: Identification of serine 138 residue in the 4-residue segment K135K136I137S138 of LukS-I component of *Staphylococcus intermedius* leukocidin crucial for the LukS-I-specific function of staphylococcal leukocidin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 328–335 (2002)
59. Otto M.: Phenol-soluble modulins. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 164–169 (2014)
60. Padmaja R.J., Halami P.M.: Molecular characterization and toxicity confirmation of LukM/F'-PV producing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis samples in Mysore, India. *Indian J. Microbiol.* **53**, 276–282 (2013)
61. Paramithiotis S., Melissari I., Drosinos E.H.: In vitro assessment of properties associated with the survival through the gastro-intestinal tract of staphylococci isolated from traditional sausage fermentation. *Food Microbiol.* **23**, 663–671 (2006)
62. Parimon T., Li Z., Bolz D.D., McIndoo E.R., Bayer C.R., Stevens D.L., Bryant A.E.: *Staphylococcus aureus* α -hemolysin promotes platelet-neutrophil aggregate formation. *J. Infect. Dis.* **208**, 761–770 (2013)
63. Paul N.C., Moodley A., Ghibaud G., Guardabassi L.: Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses Public Health.* **58**, 533–539 (2011)
64. Perreten, V., L. Guardabassi i wsp.: Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1145–1154 (2010)
65. Prevost G., Bouakham T., Piemont Y., Monteil H.: Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* **376**, 135–140 (1995)
66. Prévost G., Cribier B., Couppié P., Petiau P., Supersac G., Finck-Barbançon V., Monteil H., Piemont Y.: Pantón-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun.* **63**, 4121–4129 (1995)
67. Riegel P., Jesel-Morel L., Laventie B., Boisset S., Vandenesch F., Prévost G.: Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 237–239 (2011)
68. Różalska M., Szewczyk E.M.: *Staphylococcus cohnii* hemolysins – isolation, purification and properties. *Folia Microbiol.* **53**, 521–526 (2008)
69. Sasaki T., Kikuchi K., Tanaka Y., Takahashi N., Kamata S., Hiramatsu K.: Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2770–2778 (2007)
70. Savini V., E. Caretto i wsp.: Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a bone marrow transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1636–1638 (2013)
71. Savini V., Kosecka M., Marrollo R., Carretto E., Międobrodzki J.: CAMP test detected *Staphylococcus delphini* ATCC 49172 beta-haemolysin production. *Pol. J. Microbiol.* **62**, 465–466 (2013)
72. Savini V., Paparella A., Serio A., Marrollo R., Carretto E., Fazii P.: *Staphylococcus pseudintermedius* for CAMP-test. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 1733–1734 (2014)
73. Sawicka-Grzelak A., Szymanowska A., Młynarczyk A., Młynarczyk G.: Wytwarzanie stafylokinazy i hemolizyn przez gronkowce koagulazo-ujemne. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **45**, 7–10 (1993)
74. Singh A., Walker M., Rousseau J., Monteith G.J., Weese J.S.: Methicillin-resistant staphylococcal contamination of clothing worn by personnel in a veterinary teaching hospital. *Vet. Surg.* **42**, 643–648 (2013)
75. Slettemeas J.S., Mikalsen J., Sunde M.: Further diversity of the *Staphylococcus intermedius* group and heterogeneity in the MboI restriction site used for *Staphylococcus pseudintermedius* species identification. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **22**, 756–759 (2010)
76. Smith G.M., Shaw W.V.: Comparison of three methods for the purification of the delta hemolysin of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **124**, 365–374 (1981)
77. Smyth C.J., Möllby R., Wadström T.: Phenomenon of hot-cold hemolysis: chelator-induced lysis of sphingomyelinase-treated erythrocytes. *Infect. Immun.* **12**, 1104–1111 (1975)
78. Soedarmanto I., Kanbar T., Ülbegi-Mohyla H., Hijazin M., Alber J., Lämmler C., Akineden Ö., Weiss R., Moritz A., Zschöck M.: Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the dog owner. *Res. Vet. Sci.* **91**, 25–27 (2011)
79. Stegmann R., Burnens A., Maranta C.A., Perreten V.: Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2047–2048 (2010)
80. Sugawara T., Yamashita D., Tanaka Y., Kaneko J., Kamio Y., Tanaka I., Yao M.: Preliminary X-ray crystallographic study of staphylococcal α -hemolysin monomer. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **69**, 868–870 (2013)
81. Sung J.M.L., Chantler P.D., Lloyd D.H.: Accessory gene regulator locus of *Staphylococcus intermedius*. *Infect. Immun.* **74**, 2947–2956 (2006)
82. Szymanek K., Mynarczyk A., Mynarczyk G.: Systemy regulacyjne ekspresji genów u *Staphylococcus aureus*. *Postępy Mikrobiol.* **48**, 7–22 (2009)
83. Tajima A., Iwase T., Shinji H., Seki K., Mizunoe Y.: Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect. Immun.* **77**, 327–334 (2009)
84. Tanner M.A., Everett C.L., Douglas C., Youvan D.C.: Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1628–1631 (2000)
85. Taylor A.G., Alan W., Bernheimer A.W.: Further characterization of staphylococcal gamma-hemolysin. *Infect. Immun.* **10**, 54–59 (1974)
86. Thelestam M., Möllby R.: Effects of staphylococcal alpha-, beta-, delta-, and gamma-hemolysins on human diploid fibroblasts and HeLa cells: evaluation of a new quantitative assay for measuring cell damage. *Infect. Immun.* **8**, 938–946 (1973)
87. Vandenesch F., Célar D., Arpin D., Bes M., Greenland T., Etienne J.: Catheter-related bacteremia associated with coagu-

- lase-positive *Staphylococcus intermedius*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2508–2510 (1995)
88. Vandenesch F., Lina G., Henry T.: *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1–15 (2012)
89. Verdon J., Girardin N., Lacombe C., Berjeaud J.-M., Héchard Y.: Delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides*, **30**, 817–823 (2009)
90. De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N., Ludwig W., Rainey F., Schleifer K., Whitman W. *Bergey's manual of systematic bacteriology – Volume 3: The Firmicutes*. Springer-Verlag, New York, 2009
91. Walev I., Weller U., Strauch S., Foster T., Bhakdi S.: Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **64**, 2974–2979 (1996)
92. Van Wamel W.J.B., Rooijakkers S.H.M., Ruyken M., van Kessel K.P.M., van Strijp J.A.G.: The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* **188**, 1310–1315 (2006)
93. Wang N., Neilan A.M., Klompas M.: *Staphylococcus intermedius* infections: case report and literature review. *Infect. Dis. Rep.* **5**, 6–11 (2013)
94. Wieler L.H., Ewers C., Guenther S., Walther B., Lübke-Becker A.: Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical sampl. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 635–641 (2011)
95. Xia G., Wolz C.: Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 593–601 (2014)
96. Yamashita K., Kawai Y., Tanaka Y., Hirano N., Kaneko J., Tomita N., Ohta M., Kamio Y., Yao M., Tanaka I.: Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal gamma-hemolysin reveals the beta-barrel pore formation mechanism by two components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17314–17319 (2011)
97. Youn J.-H., Park Y.H., Hang'ombe B., Sugimoto C.: Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from companion animals and environment in the veterinary teaching hospital in Zambia, Africa. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 123–130 (2014)

Anna Maria Kot^{1*}, Stanisław Błażej¹, Agnieszka Kurcz¹, Iwona Gientka¹

¹ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wpłynęło w lutym 2015 r.

1. Wstęp. 2. Mikroorganizmy olejogenne. 3. Enzymatyczne drogi syntezy tłuszczu w komórkach drożdży. 3.1. Biosynteza tłuszczu *de novo*. 3.2. Biosynteza tłuszczu *ex novo*. 4. Czynniki wpływające na proces biosyntezy tłuszczu. 5. Próby doskonalenia genetycznego drożdży olejogennych. 6. Ekstrakcja tłuszczu z komórek drożdży. 7. Możliwości przemysłowego zastosowania tłuszczu mikrobiologicznego. 8. Podsumowanie

Yeast as a potential source of microbial fat

Abstract: The yeast which can produce more than 20% lipids in their dry matter are called oleaginous and belong mainly to the genera *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* and *Lipomyces*. The synthesis and storage of fat in yeast cells can be achieved via two pathways. In the first method – *de novo*, the acetyl-CoA and malonyl-CoA molecules are substrates of the lipid for the synthesis, while in the *ex novo* method, the hydrophobic compounds present in the environment are utilized. The process of lipid biosynthesis in yeast cells is affected by environmental factors such as carbon and nitrogen source in the medium, the C/N molar ratio, pH, temperature and the time of the cultivation. Microbial synthesis as the type of fat production process has many advantages, since it is insusceptible to weather conditions and the season of the year. Moreover, yeast show a rapid growth rate, which significantly shortens the production cycle. The main drawback of the industrial SCO production is low fat yield per unit of culture medium, which increases the total cost of the project. Microbiological fat synthesized by yeast might be used as a substitute for vegetable oils in human nutrition or as a substrate for the production of biodiesel.

1. Introduction. 2. Oleaginous microorganisms. 3. Enzymatic synthesis pathways of fat in yeast cells. 3.1. De novo lipid accumulation. 3.2. Ex novo lipid accumulation. 4. Factors affecting the biosynthesis of fat. 5. Attempts to genetically improve oleaginous yeast. 6. Extraction of fat from yeast cells. 7. Industrial applicability of microbial fat. 8. Conclusions

Słowa kluczowe: mikrobiologiczna synteza tłuszczu, mikroorganizmy olejogenne, SCO (Single Cell Oil)

Keywords: microbial synthesis of fat, oleaginous microorganisms, SCO (Single Cell Oil)

1. Wstęp

Pomysł wykorzystania drobnoustrojów do produkcji tłuszczu zrodził się w Niemczech w okresie międzywojennym. Naukowcy zaczęli prowadzić badania nad uzyskaniem zamienników tłuszczów roślinnych, których brakowało wówczas na rynku [9]. Jak podaje Ratledge pierwsze wzmianki w literaturze pochodzą z 1922 roku i dotyczyły produkcji tłuszczu mikrobiologicznego przez drożdże *Endomyces vernalis* [40]. Niestety badania te były skazane na porażkę, ze względu na brak sprzętu umożliwiającego prowadzenie procesu w urządzeniach na skalę przemysłową oraz niedostateczną wiedzę z zakresu modyfikacji genetycznych [9]. Zainteresowanie naukowców pozyskiwaniem tłuszczu mikrobiologicznego znacznie wzrosło w ciągu ostatnich 30 lat. Dokonano olbrzymich postępów w identyfikacji mikroorganizmów olejogennych oraz mechanizmów syntezy tłuszczu. Mikroorganizmy olejogenne definiowane są jako zdolne do wytwarzania i akumulacji powyżej 20% tłuszczu w suchej substancji komórkowej. W literaturze lipidy pochodzenia mikrobiologicznego

określane są skrótem SCO (Single Cell Oil). Termin ten został wprowadzony w 1974 roku przez Ratledge'a analogicznie do nazwy białka jednokomórkowców – SCP (Single Cell Protein) [9, 39].

2. Mikroorganizmy olejogenne

Wszystkie żywe organizmy wytwarzają substancje lipidowe, których zawartość w komórce nie przekracza zwykle 5% w suchej substancji. Związki te są niezbędne do budowy i prawidłowego funkcjonowania błon komórkowych [26]. Mikroorganizmy olejogenne, w specyficznych warunkach akumulują lipidy, które odkładane są w tzw. ciałkach lipidowych (ang. *lipid bodies* – LB) [21]. Tłuszcz występuje głównie w formie triacylogliceroli (ok. 80%) [38], a w mniejszych ilościach znajdują się także wolne kwasy tłuszczowe, monoacyloglicerole, diacyloglicerole, sterole, fosfolipidy i glikolipidy [35]. Budowa ciałek lipidowych jest taka sama u wszystkich organizmów eukariotycznych [18]. Hydrofobowy rdzeń otacza warstwa fosfolipi-

* Autor korespondencyjny: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159C; tel. (022) 59 37 663; e-mail: anna_kot@sggw.pl

Tabela I
Przykładowe zawartości tłuszczu w biomacie wybranych gatunków drożdży

Mikroorganizm	Źródło węgla w podłożu	Zawartość tłuszczu w suchej substancji komórkowej (% w/w)	Piśmiennictwo
<i>Cryptococcus albidus</i>	Glukoza	27,80	20
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glicerol	25,00	33
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Glukoza + ksyloza	61,40	58
<i>Pichia guilliermondii</i>	Hydrolizat inuliny	60,60	52
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glukoza	60,69	14
	Melasa	21,76	24
	Glicerol	60,70	44
<i>Rhodotorula gracilis</i>	Glicerol	25,57	10
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Skrobia z manioku	52,90	31
<i>Saccharomyces spencerorum</i>	Glicerol	37,40	3
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicerol	43,00	34
	Hydrolizat wyłoków trzciny cukrowej	58,50	50

dów związanych z białkami i w zależności od potrzeb komórki może ulegać degradacji przez specyficzne lipazy wewnątrzkomórkowe [1]. Wśród mikroorganizmów olejogennych znajdują się mikroalgi, bakterie, pleśnie oraz drożdże [35].

Bakterie rzadko zawierają więcej niż 10% tłuszczu w suchej substancji, nie wykazują również zdolności do syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Intensyfikację procesu akumulacji lipidów można osiągnąć przez zastosowanie podłoża bogatych w węglowodany oraz silne napowietrzanie hodowli [30]. Do prokariotycznych organizmów olejogennych zalicza się szereg gatunków z rodzajów *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* i *Nocardia* [2]. W warunkach niedoboru azotu *Rhodococcus* sp. i *Nocardia corallina* akumulują przede wszystkim triacyloglicerole, z niewielką ilością diacylogliceroli i estrów woskowych. Wykorzystując jako źródło węgla glukozę niektóre promieniowce mogą gromadzić nawet do 70% triacylogliceroli w suchej substancji komórkowej. Wytwarzanie i wewnątrzkomórkowa akumulacja lipidów w komórkach bakterii ma ścisły związek z fazą wzrostu i następuje po zaprzestaniu biosyntezy białka [47].

Mikroalgi są zdolne do syntezy dużych ilości lipidów, na co mają wpływ głównie intensywność światła, pH, stężenie rozpuszczonego tlenu i CO₂, stężenie składników odżywczych takich jak azot, fosfor, krzem, żelazo oraz obecność organicznych źródeł węgla. We właściwie skomponowanym podłożu i przy odpowiednio dobranych parametrach hodowli uzyskano biomasę komórkową *Schizochytrium* sp. zawierającą 77 g tłuszczu/100 g_{s.s.}, *Botryococcus braunii* (75 g tłuszczu/100 g_{s.s.}) oraz *Nannochloropsis* sp. (68 g tłuszczu/100 g_{s.s.}) [47].

Niektóre olejogenne pleśnie mają zdolność do gromadzenia aż do 85% tłuszczu w suchej substancji

komórkowej. Proces ich syntezy i akumulacji jest ściśle związany z wyczerpaniem składników odżywczych innych niż węgiel, co zapobiega proliferacji komórek, a nadal umożliwia przekształcenie substratu w lipidy [29]. Na szczególną uwagę zasługują pleśnie z rodzajów *Mucor*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Cunninghamella* i *Zygorhynchus*, które mają zdolność do syntezy dużych ilości cennych z żywieniowego punktu widzenia kwasów wielonienasyconych (PUFA) zwłaszcza kwasu γ-linolenowego (GLA) (C18:3n-6) oraz kwasu arachidonowego (ARA) (C20:4n-6) [27].

Najlepszymi producentami tłuszczu mikrobiologicznego są drożdże ze względu na ich wysoką zawartość w biomacie komórkowej. Organizmy te wykazują szybkie tempo wzrostu i niskie wymagania pokarmowe, a skład kwasów tłuszczowych można modyfikować przez zmianę warunków hodowli [1]. Szacuje się, że spośród 600 znanych gatunków drożdży mniej niż 30 zdolnych jest do syntezy powyżej 20% tłuszczu w suchej substancji komórkowej. Olejogenne drożdże należą głównie do rodzajów *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* oraz *Lipomyces* [9]. Przykładowe zawartości tłuszczu w suchej substancji komórkowej drożdży przedstawiono w tabeli I.

Profil kwasów tłuszczowych wytwarzanych przez drożdże zależy od gatunku, rodzaju zastosowanego podłoża, warunków hodowli, czasu jej trwania oraz temperatury [30]. Tłuszcze syntetyzowane przez olejogenne drożdże zawierają głównie kwasy: mirystynowy (C14:0), palmitynowy (C16:0), stearynowy (C18:0), oleinowy (C18:1), linolowy (C18:2) oraz linolenowy (C18:3) (tab. II) [32]. Kwas palmitynowy stanowi przeciętnie 15–25% (w/w) tłuszczu, natomiast kwas palmitoleinowy mniej niż 5% (w/w). Podobnie niski

Tabela II
Wzory chemiczne wybranych kwasów tłuszczowych syntetyzowanych przez drożdże

Kwas tłuszczowy	Wzór chemiczny
Kwas mirystynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Kwas palmitynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Kwas stearynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Kwas oleinowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Kwas linolowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Kwas linolenowy	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

udział w całkowitej zawartości tłuszczu syntetyzowanego przez drożdże ma kwas stearynowy (5–8%). Głównym kwasem tłuszczowym występującym w lipidach drożdży jest kwas oleinowy, a jego udział może wynosić nawet powyżej 70% (w/w). Zawartość kwasu linolowego zależy od gatunku drożdży waha się w granicach 15–25% (w/w) [35].

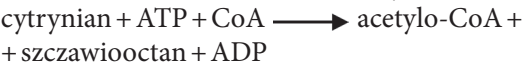
3. Enzymatyczne drogi syntezy tłuszczu w komórkach drożdży

W komórkach drożdży olejogennych synteza lipidów może przebiegać w dwojaki sposób: na drodze *de novo*, czyli z cząsteczek acetylo-CoA i malonylo-CoA (rys. 1) oraz na drodze *ex novo*, czyli z hydrofobowych substratów obecnych w środowisku (rys. 3) [9]. W metodzie *de novo* źródło węgla stanowią sacharydy takie jak glukoza, fruktoza, laktoza, sacharoza oraz cukrowe surowce odpadowe, np. melasa buraczana czy serwatka. W przypadku drugiego sposobu – *ex novo*, substratami są obecne w podłożu hodowlanym związki hydrofobowe, takie jak oleje roślinne, estry kwasów tłuszczowych, odpadowe tłuszcze pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, oleje rybne czy *n*-alkany [35].

3.1. Biosynteza tłuszczu *de novo*

Proces syntezy tłuszczu na drodze *de novo* można podzielić na dwa zasadnicze etapy. Pierwszy z nich obejmuje reakcje prowadzące do wytworzenia acetylo-CoA, a drugi konwersję tego związku do lipidów [13]. Substraty cukrowe przekształcane są w procesie glikolizy do kwasu pirogronowego, który przechodzi przez błonę mitochondrialną do matrix mitochondrialnej, gdzie kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDC) katalizuje reakcję przekształcenia pirogronianu w acetylokoenzym A. W dalszej kolejności cząsteczka ta może być włączona do Cyklu Krebsa lub stać się substratem do wytwarzania kwasów tłuszczowych. W przypadku biosyntezy tłuszczu, acetylo-CoA musi zostać przetransportowany do cytozolu, a ponieważ wewnętrzna błona mitochondrialna jest dla niego nie-

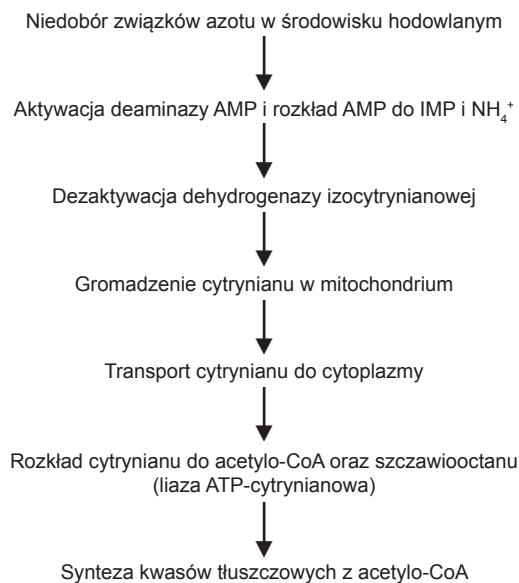
przepuszczalna, ulega kondensacji ze szczawiooctanem tworząc cytrynian [35]. W przypadku mikroorganizmów olejogennych nadprodukcja kwasu cytrynowego jest stymulowana przez niedobór związków azotowych. Na początku zostaje aktywowana deaminaza AMP (EC 3.5.4.6), katalizująca rozkład adenylozomonofosforanu (AMP) do inozynomonofosforanu (IMP) i jonów amonowych (NH_4^+), które w warunkach niedoboru stanowią dodatkowe źródło azotu [13]. Ponieważ AMP jest aktywatorem allosterycznym dehydrogenazy izocytrynianowej (EC 1.1.1.42), zmniejszenie jego stężenia blokuje cykl Krebsa na poziomie izocytrynianu, pozostającego w równowadze z kwasem cytrynowym dzięki aktywności akonitazy (EC 4.2.1.3). Gdy stężenie cytrynianu w mitochondrium osiągnie pewną wartość krytyczną, zostaje on przetransportowany do cytoplazmy, gdzie jest rozszczepiany przez liazę ATP-cytrynianową (EC 2.3.3.8) do szczawiooctanu i acetylo-CoA:



Liazę ATP-cytrynianową uznaje się za kluczowy enzym syntezy tłuszczu przez mikroorganizmy olejogenne, ponieważ w wyniku jego aktywności powstaje duża ilość acetylo-CoA [7]. Szczawiooctan w cytoplazmie zostaje przekształcony w jabłczan w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę jabłczanową (EC 1.1.1.37), który następnie ulega przemianie do pirogronianu:



Reakcję katalizuje tzw. enzym jabłczanowy (EC 1.1.1.38–40). Powstały pirogronian powraca do matrix mitochondrialnej. Podczas reakcji przekształcania jabłczanu wytworzona zostaje cząsteczka NADPH, niezbędna w procesie syntezy kwasów tłuszczowych. Chociaż szacuje się, że aktywność enzymu jabłczanowego pokrywa mniej niż 15% zapotrzebowania na NADPH (pozostała ilość pochodzi z reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową oraz dehydrogenazę 6-fosfoglukonianową) uważa się, że wytworzony w tej reakcji NADPH jest niezbędny w procesie syntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu [13]. Jak podają Ratledge i Wynn jeśli zahamowana



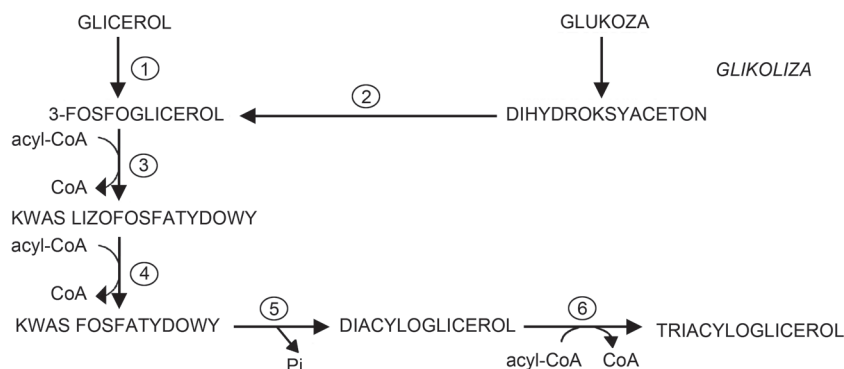
Rys. 1. Etapy prowadzące do biosyntezy tłuszczu w komórkach drożdży olejogennych na drodze *de novo* (opracowanie na podstawie [9, 33])

zostanie jego aktywność na skutek inhibicji lub mutacji, nastąpi zatrzymanie syntezy lipidów [42]. W przypadku organizmów nieolejogennych zgromadzony w cytoplazmie kwas cytrynowy może zostać wydzielony do podłoża hodowlanego lub wywołać inhibicję fosfofruktokinazy (EC 2.7.1.11), która prowadzi do wewnątrzkomórkowego gromadzenia polisacharydów [35], takich jak glikogen oraz glukany [9].

Synteza kwasów tłuszczowych rozpoczyna się od karboksylacji dwuwęglowego acetylo-CoA. Reakcję katalizuje karboksylaza acetylo-CoA (EC 6.4.1.2), zawierająca biotynę jako grupę prostetyczną. Produktem tego etapu jest trójwęglowa cząsteczka malonylo-CoA. Następnie cząsteczki acetylo-CoA i malonylo-CoA zostają przekształcone w ich ACP-pochodne, odpowiednio przez transacylazę acetylową (EC 2.3.1.38) oraz transacylazę malonylową (EC 2.3.1.39). W dalszym ciągu zachodzi etap elongacji kwasów tłuszczowych, obejmujący cztery reakcje. W pierwszym obrocie cyklu następuje konden-

sacja acetylo-ACP z malonylo-ACP do acetoacetylo-ACP, który jest redukowany do D-3-hydroksybutyrylo-ACP. Związek ten ulega odwodnieniu w wyniku czego powstaje krotonylo-ACP ulegający w dalszej kolejności redukcji do butyrylo-ACP. Reakcje katalizuje kompleks syntazy kwasów tłuszczowych (EC 2.3.1.86). Podczas kolejnych obrotów cyklu elongacji dochodzi do wydłużania łańcucha acylo-ACP, aż do powstania palmitoilo-ACP. Związek ten zawiera szesnaście atomów węgla i nie stanowi substratu dla enzymu kondensującego acetylomalonylo-ACP. W komórkach eukariotycznych, na powierzchni gładkiego retikulum endoplazmatycznego znajdują się specyficzne enzymy, katalizujące wydłużanie kwasów tłuszczowych dłuższych niż palmitynian [23].

Wytworzone kwasy tłuszczowe mogą być następnie włączone do trójglicerydów, które powstają z cząsteczek 3-fosfoglicerolu oraz acylo-CoA (cząsteczka kwasu tłuszczowego połączona z koenzymem A). W zależności od substratu oraz aparatu enzymatycznego mikroorganizmu, 3-fosfoglicerol może powstawać z fosfodihydroksyacetonu lub też bezpośrednio z glicerolu, w reakcji katalizowanej przez kinazę glicerolową. Enzymy uczestniczące w syntezie triacylogliceroli zlokalizowane są w ciałkach lipidowych oraz retikulum endoplazmatycznym (ER), natomiast acylotransferaza fosfoglicerolowa znajduje się głównie w mitochondrium. W wyniku jej aktywności 3-fosfoglicerol ulega acylacji tworząc kwas lizofosfatydowy. Z tego związku po przyłączeniu kolejnej cząsteczki acylo-CoA powstaje kwas fosfatydowy, którego defosforylacja doprowadza do wytworzenia diacyloglicerolu. Usunięcie reszty fosforanowej wymaga aktywności trzech form izomerycznych fosfatazy fosfatydowej. Jedna z nich występuje w błonie retikulum endoplazmatycznego, druga w mitochondrium, a trzecia znajduje się w cytoplazmie. Ostatni etap syntezy, czyli acylacja diacyloglicerolu, jest katalizowany przez acylotransferazę diacyloglicerolową, występującą w błonie ER [1]. Schemat syntezy triacylogliceroli przedstawiono na rys. 2.



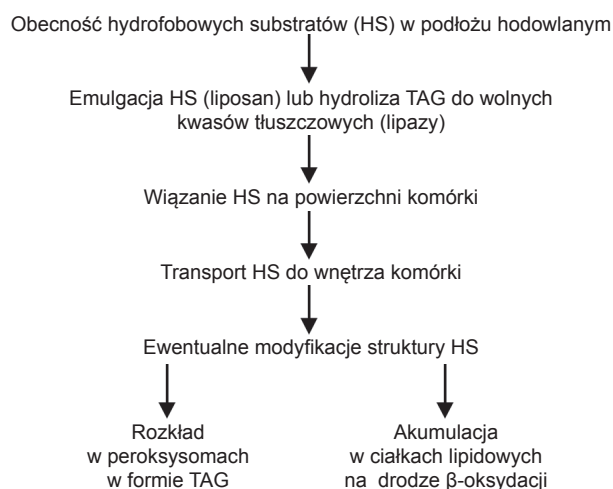
Rys. 2. Etapy syntezy triacylogliceroli (opracowanie na podstawie [1]). Enzymy katalizujące reakcje: 1) kinaza glicerolowa (EC 2.7.1.30); 2) dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa (EC 1.1.1.8); 3) acylotransferaza fosfoglicerolowa (EC 2.3.1.15); 4) acylotransferaza lizofosfatydowa (EC 2.3.1.51); 5) fosfataza fosfatydowa (EC 3.1.3.4); 6) acylotransferaza diacyloglicerolowa (EC 2.3.1.20)

3.2. Biosynteza tłuszczu *ex novo*

Niektóre gatunki drożdży są zdolne do wzrostu w podłożach zawierających hydrofobowe związki stanowiące źródło węgla oraz jednocześnie akumulacji dużych ilości tłuszczu. Drożdże te należą głównie do rodzajów *Torulopsis*, *Candida*, *Yarrowia*, *Trichosporon*, *Geotrichum* oraz *Pichia*. W metodzie *ex novo* obecne w środowisku związki hydrofobowe takie jak alkany, wolne kwasy tłuszczowe czy triacyloglicerole bezpośrednio lub po uprzedniej hydrolizie zostają przetransportowane do wnętrza komórki, gdzie mogą stanowić materiał energetyczny lub też zostać włączone do procesów biotransformacji [7, 35].

Najlepiej poznanym i opisanym w literaturze przykładem drożdży zdolnych do biosyntezy tłuszczu wewnątrzkomórkowego na drodze *ex novo* jest *Yarrowia lipolytica*. [7]. Stwierdzono, że transport hydrofobowych substratów do wnętrza komórki możliwy jest dzięki zdolności do wytwarzania liposanu, który umożliwia ich emulgację oraz dzięki możliwości wydzielania zewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych hydrolizujących triacyloglicerole do wolnych kwasów tłuszczowych [35]. Alkany wnikają natomiast do komórki w formie niezmodyfikowanej [21]. Drożdże *Y. lipolytica* są także zdolne do modyfikacji struktury ściany komórkowej, co ułatwia przyleganie związków hydrofobowych do jej powierzchni [7]. Jak podają Beopoulos i Nicaud [9] mechanizmy transportu substratów hydrofobowych nie zostały jeszcze do końca poznane. Po przedostaniu się do wnętrza komórki związki te mogą ulegać różnym modyfikacjom enzymatycznym, rozkładowi w peroksysomach na drodze β -oksydacji oraz mogą być akumulowane w postaci materiału zapasowego w ciałkach lipidowych, co przedstawiono schematycznie na rys. 3.

Wolne kwasy tłuszczowe są rozkładane w procesie β -oksydacji, w wyniku czego uwalniania jest energia



Rys. 3. Etapy prowadzące do biosyntezy tłuszczu w komórkach olejożennych drożdży *Yarrowia lipolytica* na drodze *ex novo* (opracowanie na podstawie [9])

niezbędna do wzrostu komórek oraz powstają metabolity pośrednie stanowiące prekursorzy syntezy materiałów komórkowych [35]. U drożdży enzymy uczestniczące w tym szlaku zlokalizowane są w peroksysomach [16]. Podczas jednego obrotu procesu β -oksydacji dochodzi do odłączenia jednostki dwuwęglowej (formie acetylo-S-CoA) od kwasu tłuszczowego związanego z koenzymem A [21]. Pierwszy etap katalizowany jest przez oksydazę (Aoxp) acylo-koenzymu A (EC 1.3.3.6) [16]. W komórkach drożdży *Y. lipolytica* zidentyfikowano 6 izoenzymów tej oksydazy (Aox1p, Aox2p, Aox3p, Aox4p, Aox5p oraz Aox6p), różniących się specyficznością substratową. Na przykład oksydaza Aox2p jest aktywna wobec długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, natomiast Aox3p w stosunku do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [7]. Oksydaza acylo-CoA katalizuje reakcję odwodorowania substratu. W następnych dwóch przemianach biorą udział kolejno hydrataza 2-enoilo-CoA (EC 4.2.1.17) oraz dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-CoA (EC 1.1.1.35). Ostatnią reakcję katalizuje tiolaza 3-ketoacylo-CoA (EC 2.3.1.16), w efekcie czego powstaje cząsteczka acetylo-CoA oraz cząsteczka kwasu tłuszczowego skróconego o dwie jednostki węglowe [21]. Podczas kolejnych obrotów procesu β -oksydacji dochodzi do odłączenia dwuwęglowych jednostek, aż do całkowitego rozkładu kwasu tłuszczowego. Jednakże w przypadku niektórych szczepów cząsteczka acylo-CoA, będąca produktem pośrednim cyklu może zostać z niego wyłączona, co wykorzystano w biotechnologicznej produkcji aromatów (cyklizacja kwasów tłuszczowych podczas ich rozpadu). Firma Safisis (Lesaffre, Francja) opracowała technologię otrzymywania γ -dekalaktonu, związku o zapachu brzoskwińowym, z kwasu rycynolowego. Pozyskiwany jest on na drodze „niepełnej” β -oksydacji w komórkach drożdży, podczas której uwalniany jest 10-cio węglowy hydroksylowany kwas tłuszczowy, ulegający następnie cyklizacji w warunkach wewnątrzkomórkowego pH [9].

Zasadnicza różnica między akumulacją lipidów na drodze *ex novo* a *de novo* związana jest z zawartością azotu w podłożu hodowlanym. Jak podają Papanikolaou i wsp. [35] jeśli w środowisku znajdują się hydrofobowe substraty stanowiące źródło węgla i energii, akumulacja wewnątrzkomórkowego tłuszczu następuje jednocześnie ze wzrostem komórki, w przeciwieństwie do syntezy lipidów na drodze *de novo* zachodzącej po wyczerpaniu azotu w podłożu hodowlanym.

4. Czynniki wpływające na proces biosyntezy tłuszczu

Na proces biosyntezy lipidów w komórkach drożdży mają wpływ takie czynniki jak źródło węgla i azotu w podłożu, stosunek molowy C/N, pH, zawartość

wybranych pierwiastków oraz witamin, temperatura oraz czas prowadzenia hodowli [51].

Jedną z najważniejszych czynności przy ustalaniu składu pożywki jest wytypowanie najkorzystniejszego źródła węgla dla danego mikroorganizmu. Jego preferowana forma oraz stężenie mogą się znacznie różnić nawet między gatunkami tego samego rodzaju drobnoustrojów olejogennych. Podczas wzrostu węgiel jest wykorzystywany przez mikroorganizmy jako źródło energii oraz w procesach anabolicznych, prowadzących do wytworzenia węglowodanów, tłuszczu, kwasów nukleinowych oraz białek [4]. Najczęściej wykorzystywanym w badaniach źródłem węgla jest glukoza. Maksymalna teoretyczna wydajność syntezy (obliczona jako gramy wytworzonego tłuszczu/gramy zużytego substratu węglowego) wynosi dla tego związku 33%, a dla glicerolu 30% [6, 41]. Szacuje się, że produkcja jednej tony tłuszczu mikrobiologicznego wymaga około 5 ton substratu węglowego, którego koszt znacząco decyduje o opłacalności ekonomicznej procesu [41, 51]. Dlatego w celu zastąpienia syntetycznych składników, jako źródło węgla wykorzystuje się coraz powszechniej produkty uboczne z różnych gałęzi przemysłu, takie jak melasa, serwatka, hydrolizaty skrobi, frakcja glicerynowa, odpady celulozowe oraz *n*-alakany [26, 30]. Easterling i wsp. [17] prowadzili hodowle drożdży *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091 w podłożach zróżnicowanych ze względu na rodzaj źródła węgla (glukoza, ksyloza, glicerol, glukoza + ksyloza, glukoza + glicerol, ksyloza + glicerol). Najwyższą zawartość wewnątrzkomórkowego tłuszczu (34% w suchej substancji komórkowej) uzyskano w podłożu zawierającym mieszaninę glukozy i glicerolu.

Kolejnym niezbędnym składnikiem odżywczym, który musi znaleźć się w środowisku jest azot. Podłoża hodowlane najczęściej suplementuje się w takie syntetyczne źródła tego pierwiastka jak siarczan amonu, chlorek amonu, asparaginan, glutaminian, winian amonu i ekstrakt drożdżowy. Coraz częściej w tym celu stosuje się także odpady przemysłu spożywczego, np. namok kukurydziany, odpadowe wody z produkcji glutamianu sodu oraz ziemniaczana woda sokowa powstająca podczas wytwarzania krochmalu [10, 26, 51, 54]. Rodzaj zastosowanego źródła azotu w podłożu hodowlanym ma wpływ na całkowitą zawartość tłuszczu w komórkach drożdży. Evans i Ratledge [19] zaobserwowali, że dla olejogennego szczepu drożdży *Rhodospiridium toruloides* CBS 14 zawartość wewnątrzkomórkowych lipidów wzrosła z 18 g/100 g_{s.s.}, gdy zastosowano NH₄Cl, do 50 g/100 g_{s.s.}, gdy użyto kwasu glutaminowego w tym samym stężeniu jako źródła azotu.

W fazie logarytmicznego wzrostu azot wykorzystywany jest przez drobnoustroje do syntezy aminokwasów, białek oraz kwasów nukleinowych [6, 41]. Wobec tego, gdy w środowisku zostanie wyczerpana pula

związków azotowych, zahamowana zostanie proliferacja komórek. W przypadku organizmów olejogennych deficyt ten prowadzi do ciągu reakcji biochemicznych (rozdz. 3.1), wynikiem których jest wzmożona synteza i akumulacja tłuszczu [35].

W celu zintensyfikowania wytwarzania tłuszczu przez olejogenne szczepy drożdży na drodze *de novo* należy ustalić odpowiedni stosunek molowy C/N w podłożu hodowlanym. Zwiększanie jego wartości do odpowiedniego poziomu, zależnego od szczepu powoduje wzrost zawartości lipidów w biomase i jednocześnie skutkuje zmniejszeniem tempa wzrostu. Początkowy stosunek C/N nie powinien jednak przekroczyć wartości umożliwiającej wytworzenie znacznych ilości biomasy komórkowej w logarytmicznej fazie wzrostu [1]. Ogólnie uznaje się, że proces gromadzenia tłuszczu indukowany jest stosunkiem C/N wyższym niż 20. Jednak w przypadku niektórych mikroorganizmów może on wynosić nawet 70 i więcej [36]. Dla olejogennych drożdży *Lipomyces starkeyi*, hodowanych w podłożu syntetycznym zawierającym glukozę jako źródło węgla oraz siarczan amonu jako źródło azotu, najwyższą zawartość lipidów w biomase wynoszącą 68 g/100 g_{s.s.}, uzyskano gdy początkowy stosunek C/N wynosił 150. Podczas hodowli tych samych drożdży w podłożu o C/N = 60 zawartość wewnątrzkomórkowego tłuszczu zmniejszyła się do 40 g/100 g_{s.s.} [5].

Pierwiastkiem niezbędnym do wzrostu drożdży jest również fosfor. W większości przypadków jego stężenie nie wpływa znacząco na wytwarzanie tłuszczu przez drożdże, ale może mieć wpływ na strukturę kwasów tłuszczowych. Przykładowo lipidy wyekstrahowane z biomasy drożdży *Candida utilis* uzyskanej z podłoża o ograniczonej zawartości fosforanów, charakteryzowały się zmienionym składem. W tym przypadku komponenty fosfolipidowe w dużym stopniu zostały zastąpione przez reszty polarne, niezawierające fosforu. Drożdże wymagają do wzrostu również witamin takich jak kwas pantotenowy, biotyna czy witamina B₆. Ich niedobór może prowadzić do zmian w ilości oraz składzie wytworzonych lipidów [43].

Na proces syntezy i akumulacji wewnątrzkomórkowych lipidów ma wpływ także obecność w podłożu takich kationów jak Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ i Ca²⁺. Te mikroelementy są niezbędne dla właściwej aktywności łańcucha ATP-cytrynianowej, kluczowego enzymu syntezy kwasów tłuszczowych na drodze *de novo* [11].

W celu zintensyfikowania biosyntezy tłuszczu, oprócz ustalenia optymalnego składu podłoża ważne jest także określenie odpowiedniej temperatury prowadzenia hodowli, pH środowiska oraz stopnia aeracji. Drożdże olejogenne wykazują najwyższą produktywność w temperaturze nieco niższej od optymalnej. W tych warunkach obserwuje się także wzrost zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych [51]. Przyjmuje się,

że temperatura prowadzenia hodowli powinna wynosić 25–30°C [1]. Amaretti i wsp. [4] prowadzili hodowle psychrofilnych drożdży *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 stosując różne temperatury wzrostu: –3, 0, 5, 10, 15 oraz 20°C. Najwyższą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) charakteryzował się tłuszcz wyekstrahowany z biomasy drożdży hodowanych w temperaturze 0°C, a ich udział wynosił 55,4% (w/w). Wraz ze wzrostem temperatury prowadzenia hodowli zawartość PUFA zmniejszała się do 40,6% (w/w), natomiast zwiększał się procentowy udział kwasów nasyconych, z 18,6 do 36,9 % (w/w).

Optymalna wartość pH podłoża hodowlanego mieści się w przedziale 4–8 i zależy od rodzaju mikroorganizmu oraz zastosowanego źródła węgla [18]. Johnson i wsp. [25] badali wpływ początkowej kwasowości czynnej podłoża na wydajność syntezy lipidów przez olejogonne drożdże *R. glutinis* IIP-30. Najwyższą zawartość tłuszczu, wynoszącą 66% w przeliczeniu na suchą substancję, uzyskano w podłożu o pH 4,0, natomiast przy pH 3,0, 5,0 i 6,0 wynosiła ona odpowiednio 12, 48 oraz 44%. Nie stwierdzono znaczących zmian w składzie kwasów tłuszczowych w zakresie badanych wartości kwasowości czynnych.

Stopień napowietrzania hodowli jest również ważnym czynnikiem, warunkującym zarówno wzrost drożdży jak również całkowitą zawartość tłuszczu w komórkach oraz jego skład. W warunkach ograniczonego dostępu tlenu wzrasta ilość nasyconych kwasów tłuszczowych, zmniejsza się natomiast zawartość kwasów nienasyconych, fosfolipidów i steroli [51]. Prowadzenie hodowli drożdży olejogennych wymaga również ustalenia optymalnego czasu jej trwania. Odkładanie tłuszczu w ciałkach lipidowych rozpoczyna się pod koniec wykładniczej fazy wzrostu i przebiega najintensywniej w fazie stacjonarnej [18].

5. Próby doskonalenia genetycznego drożdży olejogennych

Zwiększenie wydajności biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu oraz zmiana jego składu jakościowego jest możliwa nie tylko na drodze optymalizacji składu podłoża oraz warunków hodowli, a także poprzez zastosowanie najnowszych technik inżynierii genetycznej [9]. Ykema i wsp. [55, 56] na drodze mutagenizacji za pomocą promieniowania UV otrzymali sześć aukso-troficznych mutantów drożdży *Apiotrichum curvatum*. Analiza jakościowa tłuszczu wyizolowanego z biomasy mutantów wykazała, że różnił się on zawartością nasyconych kwasów tłuszczowych (27 do 86% SFA) w stosunku do szczepu dzikiego (44% SFA). W toku dalszych badań wybrano jednego mutantu zdolnego do biosyntezy tłuszczu o składzie zbliżonym do masła kakaowego.

Beopoulos i wsp. [8] prowadzili badania nad zwiększeniem biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu w komórkach drożdży *Y. lipolytica* przez inaktywację genu *GUT2* kodującego wytwarzanie dehydrogenazy 3-fosfoglicerolowej, katalizującej przemianę 3-fosfoglicerolu do fosfodihydroksyacetonu. Mutant charakteryzował się trzykrotnie większą zawartością tłuszczu w biomacie w porównaniu ze szczepem rodzicielskim, jednak od końca logarytmicznej fazy wzrostu odnotowano zmniejszenie jego zawartości spowodowane postępującym procesem β -oksydacji. Dlatego też dokonano dodatkowo delekcji genów *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* oraz *POX6* (kodujących wytwarzanie izoenzymów oksydazy acylo-koenzymu A, katalizujących pierwszy etap β -oksydacji) co doprowadziło do 4-krotnego wzrostu zawartości wewnątrzkomórkowego tłuszczu (41,9 g/100 g_{s.s.}) w porównaniu do szczepu dzikiego po 24 godzinach hodowli (12,8 g/100 g_{s.s.}).

Inne badania [57] prowadzone z użyciem drożdży *Y. lipolytica* dotyczyły wprowadzenia do komórek genu kodującego wytwarzanie liazy ATP-cytrynianowej (ACL), kluczowego enzymu syntezy kwasów tłuszczowych metodą *de novo* (rozdział 3.1). Aby zwiększyć ilość acetylo-CoA do komórek drożdży wprowadzono na wektorze gen syntezy ACL pochodzący z *Mus musculus*. Zawartość tłuszczu zwiększyła się z 7,3 g/100 g_{s.s.}, dla szczepu rodzicielskiego do 11–23 g/100 g_{s.s.}, dla komórek transformowanych. Stwierdzono, że nadekspresja genu syntezy ACL nie miała wpływu na skład jakościowy kwasów tłuszczowych.

Tai i Stephanopoulos [49] badali wpływ nadekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę acylotransferazy diacyloglicerolowej (DGA1) oraz karboksylazy acetylo-CoA (ACC1). Geny te zostały wprowadzone do komórek drożdży *Y. lipolytica* na plazmidach. Po 100-godzinnej hodowli drożdży transformowanych genem *ACC1* otrzymano 17,9 g tłuszczu w suchej substancji komórkowej, co dało ponad 2-krotny wzrost względem próby kontrolnej – niemodyfikowanej. Komórki *Y. lipolytica* wykazujące nadekspresję acylotransferazy diacyloglicerolowej zawierały natomiast ponad 4-krotnie więcej tłuszczu (33,8 g/100 g_{s.s.}) niż drożdże niemodyfikowane. W kolejnej części badań autorzy zastosowali konstrukt genowy zawierający zarówno gen syntezy DGA1 jak i ACC1, w wyniku czego w suchej substancji komórkowej znajdowało się 41,4% tłuszczu.

6. Ekstrakcja tłuszczu z komórek drożdży

Wydajna ekstrakcja wewnątrzkomórkowego tłuszczu stanowi bardzo ważne zagadnienie, niestety proces ten nie przebiega nigdy z wydajnością wynoszącą 100%. Spowodowane jest to obecnością grubej ściany

komórkowej, która odporna jest na wiele rozpuszczalników. Ponadto drożdże mogą wytwarzać lipazy, które przechodząc do ekstraktu zmniejszają jego stabilność. W komórkach drożdży olejogennych tłuszcz akumulowany jest w ciałkach lipidowych, w których mogą znajdować się także inne związki lipofilne. Substancje te są trudne do usunięcia podczas procesu oczyszczania lipidów. Z tych powodów metody ekstrakcji tłuszczu z biomasy drożdży są złożone [1].

W celu dezintegracji ściany komórkowej drożdży stosuje się zamrażanie lub ogrzewanie, hydrolizę chemiczną lub enzymatyczną. Jako rozpuszczalników organicznych w procesie ekstrakcji używa się powszechnie eter naftowy, chloroform, metanol lub mieszaniny chloroformu z metanolem w stosunku objętościowym 1:1 lub 2:1 [1]. Powszechnie stosowanymi metodami ekstrakcji tłuszczu z komórek drożdży są metody Soxletha, Folcha oraz Bligh and Dyer [10, 46].

7. Możliwości przemysłowego zastosowania tłuszczu mikrobiologicznego

W porównaniu do olejów roślinnych czy tłuszczów zwierzęcych, produkcja SCO wykazuje wiele zalet. Jest niezależna od warunków pogodowych, pory roku, położenia geograficznego i nie wymaga wykorzystania gruntów rolnych oraz wody do nawadniania. Drobnoustroje wykazują szybkie tempo wzrostu, co znacznie skraca cykl produkcji. Możliwe jest także wykorzystanie, jako składników podłoży produktów odpadowych z różnych gałęzi przemysłu [45]. Przeszkodę w przemysłowej produkcji SCO stanowi natomiast stosunkowo niska wydajność tłuszczu mikrobiologicznego w odniesieniu do jednostki objętości podłoża hodowlanego. Najwięcej możliwości zastosowania w różnych dziedzinach gospodarki mają lipidy otrzymywane z biomasy pleśni oraz drożdży [37].

Pierwsza przemysłowa produkcja SCO odbywała się w latach 1985–1990 w Wielkiej Brytanii. Olej mikrobiologiczny otrzymywany był z biomasy pleśni *Mucor circinelloides* i charakteryzował się wysoką zawartością niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, zwłaszcza kwasu γ -linolenowego, którego zawartość wynosiła ok. 18%. Stosowany był wówczas, jako naturalna alternatywa drogiego oleju z wiesiołka [39]. W chwili obecnej na rynku europejskim dopuszczony jest do obrotu olej o wysokiej zawartości kwasu arachidonowego, otrzymywany z biomasy pleśni *Mortierella alpina* z przeznaczeniem do stosowania w preparatach żywienia niemowląt i wcześniaków [15]. Olej bogaty w ARA (ok. 43%) produkowany jest przez Suntory Limited w Japonii pod nazwą SUNTGA40S oraz przez Cargill Alking Bioengineering (Wuhan) Co., Ltd. w Chinach pod nazwą handlową CABIO oil. W Sta-

nach Zjednoczonych w sprzedaży znajduje się także tłuszcz mikrobiologiczny otrzymywany z biomasy glonów *Schizochytrium* sp., o wysokiej zawartości kwasu dokozaheksaenowego (ok. 41%) [39].

Z uwagi na wysokie koszty procesu, najbardziej ekonomiczne jest zastosowanie drożdży do otrzymywania substytutów szlachetnych tłuszczów np. masła kakaowego, które jest powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym, przede wszystkim w procesie wytwarzania czekolady oraz w branży kosmetycznej, jako składnik nawilżający oraz natłuszczający. Jego cena ulega niestannym wahaniom, które są spowodowane przez ataki szkodników oraz grzybice niszczące plantacje kakaowca. Rozwiązaniem tego problemu mogłaby się stać produkcja tłuszczu mikrobiologicznego o cechach masła kakaowego [36]. Ykema i wsp. [55] zastosowali w tym celu aukstotroficzny mutant drożdży *Apiotrichum curvatum* Ufa25. Hodowlę prowadzono w bioreaktorze stosując, jako podłoże odpadową serwatkę wzbogaconą w olej rzepakowy, będący źródłem kwasu oleinowego. Po 120 godzinach prowadzenia procesu uzyskano średnio 6 g lipidów/litr podłoża. Otrzymany tłuszcz charakteryzował się składem zbliżonym do masła kakaowego i zawierał 40% (w/w) kwasu stearynowego, 25% (w/w) kwasu palmitynowego, 20% (w/w) kwasu oleinowego oraz 10% (w/w) kwasu linolowego. Zastosowanie serwatki, jako podłoża hodowlanego, dodatkowo czyniło proces bardziej opłacalnym ekonomicznie.

Wiele opracowań naukowych [17, 32, 41] skupia się nad potencjalnym wykorzystaniem tłuszczu mikrobiologicznego, jako substratu do produkcji biodiesla tzw. III generacji. W 2008 roku Ratledge i Cohen [41] przedstawili wyliczenia dotyczące ekonomicznej opłacalności takiego przedsięwzięcia. Przy założeniu, że wytworzenie 1 tony oleju mikrobiologicznego wymaga dostarczenia 5 ton glukozy, szacunkowy koszt wynosił około 3000 \$ za tonę tłuszczu. Cena powszechnie używanego do produkcji biodiesla oleju rzepakowego kształtowała się na poziomie około 1500 \$/tonę. Na podstawie danych opublikowanych przez Departament Rolnictwa USA dotyczących cen glukozy oraz oleju rzepakowego w 2013 roku [12, 48] można obliczyć, że w chwili obecnej przybliżony koszt wyprodukowania tony tłuszczu przez drożdże wynosi ok. 3400 \$. Cena oleju rzepakowego kształtuje się na poziomie około 1300 \$/tonę, z czego wynika, że aktualnie tłuszcz mikrobiologiczny jest zbyt drogą alternatywą dla tradycyjnie stosowanych substratów pochodzenia roślinnego.

8. Podsumowanie

W ciągu ostatnich lat zainteresowanie naukowców mikrobiologiczną syntezą tłuszczu wzrosło. Poznano drogi biochemiczne syntezy lipidów w komórkach

drożdży, przeprowadzonych zostało również wiele badań dotyczących optymalizacji warunków hodowli i składu podłoża hodowlanego do wydajnej biosyntezy oraz zastosowano modyfikacje genetyczne w celu jej zwiększenia. Tłuszcze wytwarzane przez drożdże mają wiele potencjalnych zastosowań. Główną zaletą wytwarzania SCO jest jej niezależność od klimatu, natomiast wysoka cena ogranicza stosowanie procesów mikrobiologicznej syntezy tłuszczu do wytwarzania produktów szlachetnych takich jak substytuty masła kakaowego czy preparaty kwasów nienasyconych z przeznaczeniem uzupełnienia ich niedoborów w diecie ludzi i zwierząt. W związku z tym, dalsze badania w tym kierunku będą dotyczyły obniżenia całkowitych kosztów produkcji SCO, np. przez wykorzystanie przemysłowych produktów odpadowych, jako składników podłoży hodowlanych, czy też modyfikacje genetyczne drożdży w celu zwiększenia biosyntezy.

Piśmiennictwo

- Ageitos J.M., Vallejo J.A., Veiga-Crespo P., Villa T.G.: Oily yeast as oleaginous cell factories. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 1219–1227 (2011)
- Alvarez H.M., Steinbüchel A.: Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 367–376 (2012)
- Amaretti A., Raimondi S., Leonardia A., Rossi M.: *Candida freyschussii*: an oleaginous yeast producing lipids from glycerol. *Chem. Eng. Trans.* **27**, 139–144 (2012)
- Amaretti A., Raimondi S., Sala M., Roncaglia L., De Lucia M., Leonardi A., Rossi M.: Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb. Cell Fact.* **9**, doi: 10.1186/1475-2859-9-73 (2010)
- Angerbauer C., Siebenhofer M., Mittelbach M., Guebitz G.M.: Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **99**, 3051–3056 (2008)
- Armenta R.E., Valentine M.C.: Single-Cell Oils as a source of Omega-3 fatty acids: an overview of recent advances. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 167–182 (2013)
- Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarrea J.L., Molina-Jouve C., Nicaud J.M.: *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res.* **48**, 375–387 (2009)
- Beopoulos A., Mrozova Z., Thevenieau F., Le Dall M.T., Hapala I., Papanikolaou S., Chardot T., Nicaud J.M.: Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 7779–7789 (2008)
- Beopoulos A., Nicaud J.M.: Yeast: A new oil producer? *OCL*, **19**, 22–28 (2012)
- Błażej S., Gientka I., Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Różańska L., Maszewska M.: Ocena zdolności biosyntezy tłuszczu przez drożdże *Rhodotorula gracilis* w podłożach zawierających ziemniaczaną odpadową wodę sokową wzbogaconą glicerolem. *ZPPNR*, **576**, 3–12 (2014)
- Boulton C.A., Ratledge C.: Partial purification and some properties of ATP:citrate lyase from the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2863–2869 (1983)
- Canola. United States Department of Agriculture. <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/canola.aspx> (21.02.2015)
- Christophe G., Kumar V., Nouaille R., Gaudet G., Fontanille P., Pandey A., Soccol C.R., Larroche C.: Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? *Braz. Arch. Biol. Technol.* **55**, 29–46 (2012)
- Dai C.C., Tao J., Xie F., Dai Y.J., Zhao M.: Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 2130–2134 (2007)
- Decyzja Komisji Europejskiej z dnia 12 grudnia 2008 r. zezwalająca na wprowadzenie do obrotu oleju z *Mortierella alpina* o wysokiej zawartości kwasu arachidonowego jako nowego składnika żywności zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady (notyfikowana jako dokument nr C(2008) 8080)
- Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Strub C., Schorr-Galindo S.: Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass Bioenergy*, **68**, 135–150 (2014)
- Easterling E.R., French W.T., Hernandez R., Licha M.: The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour. Technol.* **100**, 356–361 (2009)
- Enshaeieh M., Abdoli A., Nahvi I.: Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Yarrowia lipolytica* M7 and *Candida* sp. *Journal of Cell and Molecular Research*, **5**, 17–23 (2013)
- Evans C.T., Ratledge C.: Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1693–1704 (1984)
- Fei Q., Chang H.N., Shang L., J.D., Kim N., Kang J.: The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **102**, 2695–2701 (2011)
- Fickers P., Benetti P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M.: Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* **5**, 527–543 (2005)
- Fidler N., Koletzko B., Sauerwald T.U.: Single cell oils production and application. *Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, **74**, 37–45 (1999)
- Hames D.B., Hooper N.M.: Metabolizm lipidów (w) Biochemia. Krótkie wykłady, red. Hames D.B., Hooper N.M., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353–389
- Johnson V.W., Singh M., Saini V.S., Adhikari D.K., Sista V., Yadav N.K.: Utilization of molasses for the production of fat by an oleaginous yeast, *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 1–4 (1995)
- Johnson V., Singh M., Saini V.S., Sista V.R., Yadav N.K.: Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 382–384 (1992)
- Kaboosi H., Behbahani B.: An overview on effective parameters in production of single cell oil by microorganisms especially the fungus of *Mortierella isabellina*. *Annals of Biological Research*, **3**, 1650–1654 (2012)
- Kavadia A., Komaitis M., Chevalot I., Blanchard F., Marc I., Aggelis G.: 2001: Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**, 341–346 (2001)
- Kegg Pathway Database. GenomeNet, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (18.02.2015)
- Kendrick A., Ratledge C.: Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, **27**, 15–20 (1992)
- Leman J., Bednarski W.: Mikrobiologiczna synteza tłuszczu. *Post. Mikrobiol.* **26**, 277–291 (1987)

31. Li M., Liu G.L., Chi Z., Chi Z.M.: Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass Bioenergy*, **34**, 101–107 (2010)
32. Li Q., Du W., Liu D.: Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 749–756 (2008)
33. Meesters P.A.E.P., Huijberts G. N. M., Eggink G.: High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 575–579 (1996)
34. Papanikolaou S., Aggelis G.: Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol.* **82**, 43–49 (2002)
35. Papanikolaou S., Aggelis G.: Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1031–1051 (2011)
36. Papanikolaou S., Aggelis G.: Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1052–1073 (2011)
37. Ratledge C.: Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, **86**, 807–815 (2004)
38. Ratledge C.: Lipid biotechnology: A wonderland for the microbial physiologist. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 1647–1656 (1987)
39. Ratledge C.: Microbial oils: an introductory overview of current status and future prospects. *OCL*, **20**, D602 (2013)
40. Ratledge C.: Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids w: Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids, red. B.S. Kamel, Y. Kakuda, Springer, Londyn, 1994, s. 235–291
41. Ratledge C., Cohen Z.: Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, **20**, 155–160 (2008)
42. Ratledge C., Wynn J.P.: The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **51**, 1–51 (2002)
43. Rattray J.B.M., Schibeci A., Kidby D.K.: Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* **39**, 197–231 (1975)
44. Saenge Ch., Cherisilp B., Suksaroge T., Bourtoom T.: Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bio-conversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem.* **46**, 210–218 (2011)
45. Santos C.A., Caldeira M.L., Lopes da Silva T., Novais J.M., Reis A.: Enhanced lipidic algae biomass production using gas transfer from a fermentative *Rhodospiridium toruloides* culture to an autotrophic *Chlorella protothecoides* culture. *Bioresour. Technol.* **138**, 48–54 (2013)
46. Schneider R., Daum G.: Extraction of yeast lipids. *Methods Mol. Biol.* **313**, 41–45 (2006)
47. Subramaniam R., Dufreche S., Zappi M., Bajpai R.: Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 1271–1287 (2010)
48. Sugar and Sweeteners Yearbook Tables. United States Department of Agriculture. <http://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables.aspx> (21.02.2015)
49. Tai M., Stephanopoulos G.: Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab. Eng.* **15**, 1–9 (2013)
50. Tsigie Y.A., Wanga C.Y., Truong C.T., Ju Y.H.: Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour. Technol.* **102**, 9216–9222 (2011)
51. Turcotte G., Kosaric N.: Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **40**, 73–92 (1989)
52. Wang G.Y., Chi Z., Song B., Wanga Z.P., Chi Z.M.: High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcl22. *Bioresour. Technol.* **124**, 77–82 (2012)
53. Wild R., Patil S., Popovic M., Zappi M., Dufreche S., Bajpai R.: Lipids from *Lipomyces starkeyi*. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 329–335 (2010)
54. Xue F., Miao J., Zhang X., Luo H., Tan T.: Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresour. Technol.* **99**, 5923–5927 (2008)
55. Ykema A., Kater M.M., Smit H.: Lipid production in whey permeate by an unsaturated fatty acid mutant of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Biotechnol. Lett.* **11**, 477–482 (1989)
56. Ykema A., Verbree E.C., Verwoert I.I.G.S., van der Linden K.H., H. Nijkamp H.J.J., Smit H.: Lipid production of revertants of Ufa mutants from the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 176–182 (1990)
57. Zhang H., Zhang L., Chen H., Chen Y.Q., Chen W., Songa Y., Ratledge C.: Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP: citrate lyase from *Mus musculus*. *J. Biotechnol.* **192**, 78–84 (2014)
58. Zhao X., Kong X., Hua Y., Feng B., Zhao Z.: Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**, 405–412 (2008)

COMPARTMENTALIZATION IN CEPHALOSPORIN C BIOSYNTHESIS BY INDUSTRIAL STRAINS OF *ACREMONIUM CHRYSOGENUM*

Wiesław Kurzątkowski^{1*}, Anita Gębska-Kuczerowska²

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

²Department of Health Promotion and Postgraduate Education, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Warsaw, Poland

Submitted on February, 2015

1. Introduction. 2. The pathway of cephalosporin C biosynthesis. 3. Secondary metabolism of cephalosporin C. 4. Cellular localization of enzymes involved in cephalosporin C biosynthesis (compartmentalization). 5. Role of peroxisomes in cephalosporin C biosynthesis. 6. Industrial strain improvement. 7. β -lactams in the treatment of various bacterial infections – mode of action. 8. Conclusions

Abstract: Cephalosporin C biosynthesis is a compartmentalized process located mainly in the sub-apical, productive, non-growing cells of the hyphae, which under the conditions of the industrial technology build well-dispersed flocculent mycelia. In this paper, the cephalosporin C production by industrial strains of *Acremonium chrysogenum* (syn. *Cephalosporium acremonium*) is described, including the central role of peroxisomes in the biosynthesis and secretion of this antibiotic and other β -lactams. The localization of the pathway of cephalosporin C biosynthesis and important transport steps of intermediates and the end-products are also discussed.

Ultrastrukturalna organizacja komórek grzybnia *A. chrysogenum* podczas produkcji cefalosporyny C na skalę przemysłową

Streszczenie: W niniejszej pracy omówiono rolę peroksysomów w wytwarzaniu cefalosporyny C przez przemysłowe szczepy *A. chrysogenum*. Przedstawiono lokalizację enzymów szlaku biosyntezy cefalosporyny C w dojrzałych metabolicznie aktywnych nierosnących komórkach grzybnia. Omówiono także niektóre aspekty zwiększania wydajności szczepów przemysłowych.

1. Wprowadzenie. 2. Szlak biosyntezy cefalosporyny C. 3. Wtórny metabolizm cefalosporyny C. 4. Lokalizacja enzymów biosyntezy cefalosporyny C w komórkach producenta. 5. Rola peroksysomów w biosyntezie cefalosporyny C. 6. Zwiększanie wydajności szczepów przemysłowych. 7. Rola antybiotyków β -laktamowych w leczeniu – mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych. 8. Wnioski

Key words: *A. chrysogenum*, cephalosporin C, biosynthesis, peroxisomes

Słowa kluczowe: *A. chrysogenum*, cefalosporyna C, biosynteza, peroksysomy

1. Introduction

Cephalosporin C was shown to be active against Gram-positive and Gram-negative bacteria. At present, *A. chrysogenum* is cultured worldwide to yield approximately 2,500 tons (annual production) of semi-synthetic derivatives of cephalosporin C which are mainly used as broad-spectrum antibiotics for the treatment of bacterial infections. This review starts with a summary of the pathway of cephalosporin C biosynthesis, followed by an overview of the compartmentalization in cephalosporin C biosynthesis by *A. chrysogenum*. Then an outline of the role of peroxisomes in cephalosporin C biosynthesis is given, and additionally the industrial strain improvement is detailed.

2. The pathway of cephalosporin C biosynthesis

The pathway of cephalosporin C biosynthesis is shown in Fig. 1 and detailed in Fig. 2. The biosynthesis of this antibiotic starts by the non-ribosomal con-

densation of three amino acids, i.e.: L- α -aminoadipic acid (non-proteinogenic amino acid – in fungi synthesized by a specific aminoadipate pathway, which leads to the formation of lysine), L-cysteine and L-valine (ubiquitous amino acids) to form the tri-peptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV). This reaction is catalyzed by the ACV synthetase (ACVS) – encoded by the *pcbAB* gene [1, 14]. ACVS in sequence activates the three amino acids with ATP to form aminoacyl-adenylates, binds them to the enzyme as thioesters, epimerizes the L-valine to D-valine, links together the three amino acids to form the ACV-peptide, and releases the tri-peptide from the enzyme by the action of an internal thioesterase activity [17]. Subsequently, the ACV tri-peptide is cyclized to isopenicillin N (IPN) by the isopenicillin N synthase (IPNS, cyclase) – encoded by *pcbC* gene. The IPN synthases require Fe^{2+} , molecular oxygen and ascorbate. They remove four hydrogen atoms from the ACV tri-peptide [for review, see 17]. In this oxidative ring closure reaction a bi-cyclic penam nucleus, consisting of a β -lactam and thiazolidine ring is formed. In *Penicillium*, IPN is

* Corresponding author: Independent Laboratory of Streptomyces and Fungi Imperfecti, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, 00-791 Warsaw, Poland; e-mail: wkurzatkowski@pzh.gov.pl

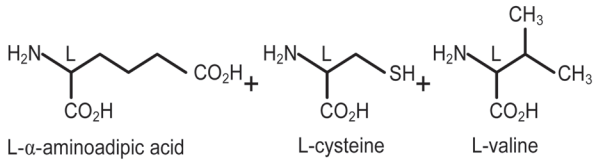
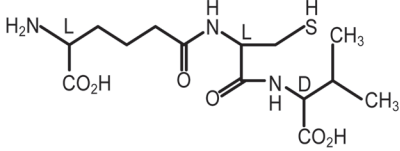
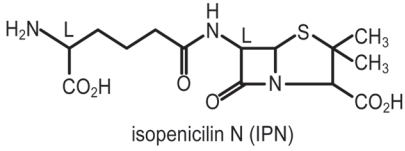
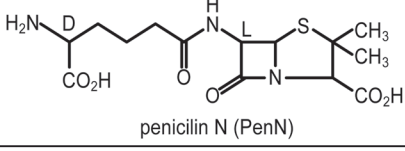
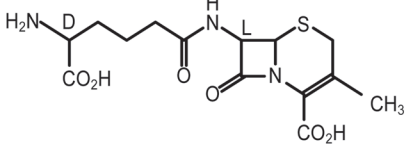
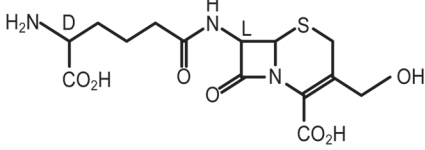
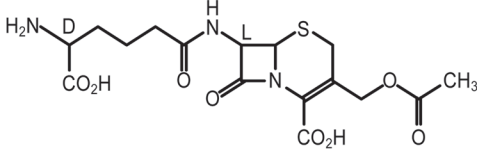
		Localization
		Medium, cytosol and vacuolar pool
ACV synthetase (ACVS) ↓ <i>pcbAB</i>		Cytosol
		Cytosol
IPN synthase (IPNS) ↓ <i>pcbC</i>		Cytosol
		IPN transport from the cytosol into the peroxisome by the Cef P transporter
two-component IPN epimerization system ↓ <i>cefD1-cefD2</i>		Peroxisome
		PenN transport from the peroxisome into the cytosol by the Cef M transporter
DAOC synthase (DAOCS; expandase) ↓ <i>cefE / cefEF</i>		Cytosol
		Cytosol
DAC synthase (DACS; hydroxylase) ↓ <i>cefF / cefEF</i>		Cytosol
		Cytosol
acetyl-CoA:DAC acetyltransferase (DAT) ↓ <i>cefG</i> AC-CoA → CoA		Cytosol
		Transport of CPC from the cytosol into the medium by the Cef T transporter

Fig. 1. Compartmentalization of cephalosporin C biosynthetic pathway in the productive sub-apical non-growing mycelial cells of *A. chrysogenum*. Note the peroxisomal conversion of isopenicillin N into penicillin N by the two-protein CefD1-CefD2 epimerization system (details in Fig. 2). ACVS, IPNS, DAOCS, DACS and DAC acyltransferase are cytosol enzymes. In *Streptomyces clavuligerus* [27] and other bacteria the enzymes DAOCS and DACS are encoded by the separate *cefE* and *cefF* genes. The proposed localization of the β -lactam transporters, i.e.: CefP, CefM and CefT are indicated (Author: W. Kurzątkowski).

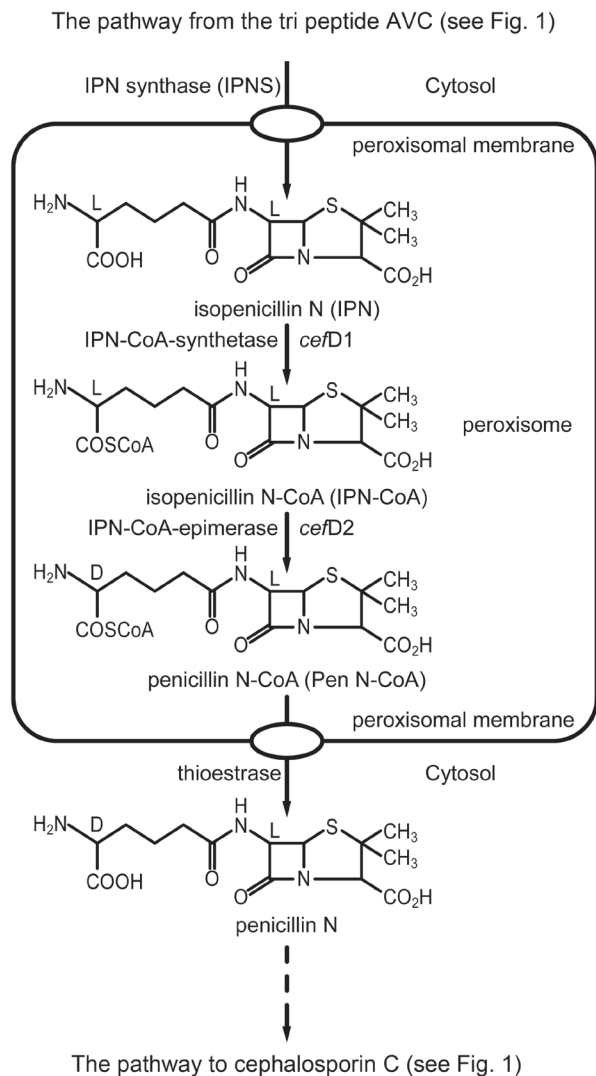


Fig. 2. The peroxisomal conversion of IPN to Pen N by the two protein cefD1-cefD2 epimerization system composed of: IPN-CoA synthetase and IPN-CoA epimerase is shown. All other steps in cephalosporin C biosynthesis are located in the cytosol (Author: W. Kurzątkowski)

converted to hydrophobic penicillins, e.g. penicillin G [15, 16, 35, 36]. The formation of IPN is the branch point of penicillin and cephalosporin biosynthesis. In *Acremonium*, streptomycetes and all other cephalosporin and cephalomycin producers, IPN is converted (Fig. 1 and Fig. 2) to penicillin N (D-isomer of IPN) by an epimerization CefD1-CefD2 system [for review, see 29]. The following step in cephalosporin C biosynthesis is the enzymatic expansion of the five-membered thiazolidine ring of penicillin N to a six-membered dihydrothiazine ring. This conversion is catalyzed by the deacetoxycephalosporin C (DAOC) synthase (DAOCS) – encoded by the *cefEF* gene. The DAOCS requires Fe^{2+} , molecular oxygen and α -ketoglutarate to form DAOC and succinic acid. This enzyme does not recognize IPN, penicillin G or the 6-aminopenicillanic acid as substrates [for review, see 17; Wu et al. 37]. The

DAOCS from *A. chrysogenum* is also able to catalyze the hydroxylation of DAOC at C-3 forming deacetylcephalosporin C. In the last step of cephalosporin C biosynthesis, the transfer of an acetyl-moiety from the acetyl-coenzyme A to hydroxyl group on the sulfur-containing ring of deacetylcephalosporin C leads to the formation of cephalosporin C, which possesses high antibacterial activity [29]. This reaction is catalyzed by the acetyl-Coenzyme A (CoA):DAC acetyltransferase – encoded by *cefG* gene.

3. Secondary metabolism of cephalosporin C

Penicillins and cephalosporins, like many other secondary metabolites, have unusual chemical structures [2, 3, 9, 15, 16, 18]. Cephalosporin C produced by the fungi *A. chrysogenum*, *Paecilomyces persicinus*, *Kallitichroma tethys* and other deuteromycetes contains the cephem nucleus composed of a six-membered dihydrothiazine ring fused to the β -lactam ring. This β -lactam has a D- α -aminoadipyl side-chain attached to the C-7 amino group [13]. The most important feature classifying these antibiotics as secondary metabolites is the non-ribosomal condensation of the ACV tri-peptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine that is characterized by the unusual δ - α peptide binding between the carboxylic group located in the position δ of the L- α -aminoadipic acid and the α -amino group of the L-cysteine. Further features are the LLD-configuration of the ACV-tri-peptide [35, 36] as well as the formation of bi-cyclic penam (penicillins) or cephem (cephalosporins and cephamycins) nuclei [16]. In the primary metabolism the peptides are synthesized in the process of transcription and translation and are composed of linearly arranged amino acids combined with peptide bindings formed from carboxylic groups and amino groups situated in the position α of the amino acids. Other feature is the branching from the pathways of the primary metabolism (L- α -aminoadipic acid, L-cysteine and L-valine) of unusual short one-way biosynthetic roads leading, in filamentous fungi, to the formation of penicillins and cephalosporins that exist in the cells of the producers as non-metabolized end-products which are finally secreted from the cells of the mycelium into the cellular medium.

4. Cellular localization of enzymes involved in cephalosporin C biosynthesis (compartmentalization)

The proposed compartmentalization of the cephalosporin C biosynthetic pathway in the sub-apical non-growing cells of the mycelium is shown in Figs. 1, 2.

The enzymes catalyzing the last two steps in penicillin biosynthesis (phenylacetyl-CoA ligase and IPN acyltransferase) are located in peroxisomes – also called microbodies [5, 15, 16, 18, 22, 34], as shown by immunoelectron microscopy. Similarity (Fig. 2), the *Acremonium* two-protein CefD1-CefD2 epimerization system converting IPN to penicillin N is also located in peroxisomes [17]. All other enzymes of the pathway of cephalosporin C biosynthesis, i.e.: ACVS, IPNS, DAOCS, DACS, DAC acetyltransferase are soluble cytosol enzymes [33]. This distinct sub-cellular compartmentalization implies intracellular transport of IPN and penicillin G in the penicillin G pathway or IPN and penicillin N in the cephalosporin C route as well as enables the spatial separation of procedures and enzymes simplifying the regulation and optimization of the processes involved.

5. The role of peroxisomes in cephalosporin C biosynthesis

The biosynthetic pathway of cephalosporin C is compartmentalized in the productive mycelial cells of *A. chrysogenum* and takes place in the cytosol, and in the peroxisomes, like the biosynthetic pathway of penicillin G in *Penicillium chrysogenum*. The peroxisomal conversion of IPN to penicillin N by the protein CefD1-cefD2 epimerization system in cephalosporin C biosynthesis [32] is presented in Fig. 2. This compartmentalization implies intracellular transport of IPN and Pen N in the cephalosporin C pathway. The CefM protein seems to act as a transporter between the peroxisomal lumen and the cytosol to provide the penicillin N intermediate for the reactions catalyzed by the expandase/hydroxylase and acetyl-CoA:DAC acetyltransferase. Three transporters, i.e.: CefP, CefM and CefT are considered in the transport of intermediates and/or secretion of cephalosporins [5, 24, 31, 33]. The results from our experimental programs using transmission electron microscopy exhibit in the sub-apical productive non-growing cells of the high-yielding industrial strain of *A. chrysogenum* numerous mainly spherical peroxisomes from 0.1 μm up to 0.4 μm in diameter which are frequently accompanied by numerous mitochondria and polyribosomes (Fig. 3). Such an arrangement of peroxisomes may increase the IPN-CoA synthetase and IPN-CoA-epimerase (CefD1/CefD2 epimerization system) supplying the efficacy in cephalosporin C biosynthesis. Small peroxisomes could be observed rarely in the apical cells located 1.0–2.0 μm from the apex of the hyphae and in the sub-apical growing regions of the industrial strain. In the late-apical highly vacuolated cells massive autophagy was observed. In these cells autophagosomes-like structures could be

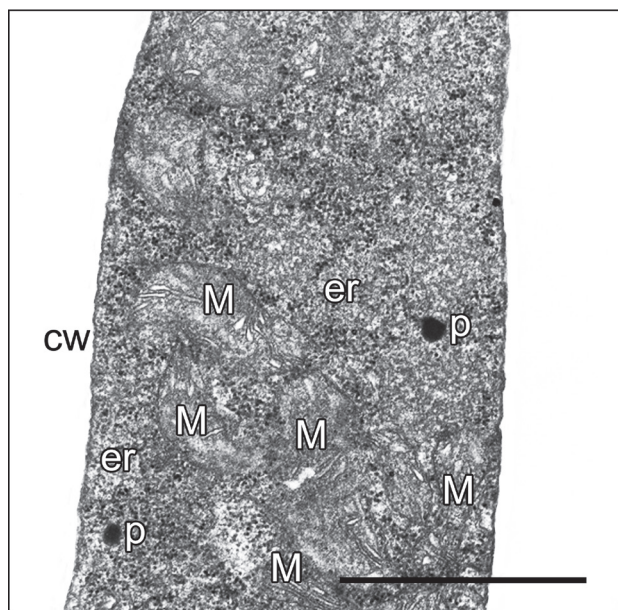


Fig. 3. *A. chrysogenum* (high-yielding, industrial strain). The young-mature sub-apical productive non-growing mycelial cell can be characterized as follows. The protein-rich cytoplasm is densely packed with ribosomes and mitochondria (M), that are associated with peroxisomes (p) of about 0.1–0.2 μm in diameter. The cell wall (cw) is composed of one thin electron-transparent layer, bar = 1 μm (Author: W. Kurzątkowski).

observed. Autophagy was accompanied by cytoplasm and peroxisome degradation. Small peroxisomes were also rarely visible in the cells of the low-cephalosporin-producing strain *A. chrysogenum* (data not shown). These results support strongly the participation of peroxisomes in cephalosporin C biosynthesis. Our observations are consistent with the reported positive correlation between penicillin G biosynthesis and the number of large peroxisomes in sub-apical productive non-growing mycelial cells of *P. chrysogenum* [11, 12, 15, 16, 19, 23]. Two models of peroxisome development have been documented, the *de novo* synthesis from the endoplasmic reticulum and multiplication by fission of pre-existing organelles [2, 3, 7, 8, 15, 16, 19, 20, 21, 24, 26, 28, 30].

6. Industrial strain improvement

Classical strain improvement has yielded industrial *A. chrysogenum* strains that produce high titers of cephalosporin C. In approximately 50 years, intensive strain improvement programs mainly mutation and selection resulted in production of strains that yield significantly higher titer of the cephalosporin C than wild-type strains. At present, the genetic engineering techniques together with conventional strain improvement procedures seem to be a perspective to increase the yield of cephalosporin C production. The industrial

strains exhibit elevated transcription of genes involved in β -lactams biosynthesis [35, 36]. At present, for industrial strain improvement, further experimental work is required to elucidate the role of transporters in the production of β -lactam antibiotics to increase translocation of the intermediates and secretion of the final products [11].

7. The β -lactams in the treatment of various bacterial infections – mode of action

Cephalosporins are members of the large group of β -lactam antibiotics, which inhibit the growth of Gram-negative and Gram-positive bacteria at low concentration. These antibiotics are widely used in human medicine. All β -lactams contain a four-membered β -lactam ring closed by an amide bound that is immediately involved in the mode of action of these antibiotics [6] by acylation of the hydroxyl group of serine located in the active centre of DD-carboxypeptidase/transpeptidases (DD-peptidases). Such an acylation results in inhibition of DD-peptidases (catalyzing the cross-linking of the peptidoglycan) causing the death of bacterial cells. The mechanisms of the always increasing resistance of bacteria to the natural and semi-synthetic β -lactams include numerous mutations leading to the production of a large number of sensitive β -lactamases (accepting the novel β -lactams) and/or modified DD-peptidases (not accepting the novel β -lactams). Therefore, the necessary prerequisite is the continuous search for novel β -lactams that are resistant to the actually produced β -lactamases and efficient against the DD-peptidases.

8. Conclusions

The sub-apical mature non-growing peroxisomal cells of the high-yielding strain are privileged in cephalosporin C biosynthesis. The *A. chrysogenum* two-protein CefD1-CefD2 epimerization system converting IPN to Penicillin N is located in peroxisomes. Other enzymes of the pathway of cephalosporin C biosynthesis are soluble cytosolic enzymes. For improvement of industrial strains further work is required to elucidate the role of the CefP and CefT transporters in cephalosporin C biosynthesis by *A. chrysogenum*. The inhibition of autophagy is also a possibility for industrial strain improvement.

Acknowledgements

This work was supported by the PTP No. 1990/1995 grant from the Polfa-Tarchomin Pharmaceutical Works, Warsaw, Poland and National Institute of Hygiene, Warsaw, Poland and by the statutory activity No. 22/EN.1 of the National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene.

References

- Aharanovitz Y., Zhang J.I., co-workers.: Delta-(L- α -amino-adipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, the multienzyme integrating the four primary reactions in β -lactam biosynthesis, as a model peptide synthetase. *Nat. Biotechnol.* **11**, 807–810 (1993)
- Bartoszewska M., Kiel J.A., Bouvenberg R.A., Veenhuis M., van der Klei I.J.: Autophagy deficiency promotes β -lactam production in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1413–1422 (2011)
- Bartoszewska M., Opaliński Ł., Veenhuis M., van der Klei I.J.: The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1921–1931 (2011)
- Brakhage A.A., Spröte P., Al-Abdallah Q., Gehrke A., Plattner K., Tüncher A.: Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **88**, 45–90 (2004)
- Evers M.E., Trip H., van den Berg M.A., Bovenberg R.A., Driessen A.J.: Compartmentalization and transport in β -lactam antibiotics biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **88**, 111–135 (2004)
- Frère J.M., Nguyen Distèche M., co-workers. Mode of action: interaction with the penicillin binding proteins (in) *Chemistry of β -lactams*, Ed: M. I. Page, Blackie Academic and Professional, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1992, 149–197
- Hoepfner D., Schildknecht D., Braakman I., Philippsen P., Tabak H.F.: Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell*, **122**, 85–95 (2005)
- Jourdain I., Sontam D., Johnson C., Dillies C., Hyams J.S.: Dynamic-dependent biogenesis cell cycle regulation and mitochondrial association of peroxisomes in fission yeast. *Traffic*, **9**, 353–365 (2008)
- Keller N.P., Turner G., Bennett J.W.: Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 937–947 (2005)
- Kiel J.A., van den Berg M.A., Fusetti F., Poolman B., Bouvenberg R.A., Veenhuis M., van der Klei I.J.: Matching the proteome to the genome: the microbody of penicillin-producing *Penicillium chrysogenum* cells. *Funct. Integr. Genomics*, **9**, 167–184 (2009)
- Kiel J.A., van der Klei I.J.: Proteins involved in microbody biogenesis and degradation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 62–71 (2009)
- Kiel J.A., van der Klei I.J., van den Berg M.A., Bovenberg R.A., Veenhuis M.: Overproduction of a single protein, Pc-Pex1p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal. Genet. Biol.* **42**, 154–164 (2005)
- Kim C.F., Lee S.K., Price J., Jack R.W., Turner G., Kong R.Y.: Cloning and expression analysis of the *pcbAB-pcbC* beta-lactam genes in the marine fungus *Kallichroma tethus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1308–1314 (2003)
- Kleinkauf H., von Döhren H.: A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **236**, 335–351 (1996)
- KurzaŃkowski W., Staniszevska M., Gębska-Kuczerowska A.: Compartmentalization in penicillin G biosynthesis by *Penicillium chrysogenum* PQ-96. *P. J. Microbiol.* **63**, 399–408 (2014)
- KurzaŃkowski W., Staniszevska M., Gębska-Kuczerowska A.: Penicillin G production by industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **53**, 366–370 (2014)
- Martin J-F. Ullán R.V., Garcia-Estrada C. Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. *Microb. Biotechnol.* **3**, 285–299 (2010)
- Martin J-F. Ullán R.V., Garcia-Estrada C. Role of peroxisomes in the biosynthesis and secretion of β -lactams and other secondary metabolites. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 367–382 (2012)

19. Meijer W.H., Gidijala L., Fekken S., Kiel J.A., van den Berg M.A., Lascaris R., Roal A.L., Bovenberg R.A., van der Klei I.J.: Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5702–5709 (2010)
20. Motley A.M., Hettema E.H.: Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J. Cell. Biol.* **178**, 399–410 (2007)
21. Motley A.M., Ward G.P., Hettema E.H.: Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p. *J. Cell. Sci.* **121**, 1633–1640 (2008)
22. Müller W.H., Essers J., Humbel B.M., Verkleij A.J.: Enrichment of *Penicillium chrysogenum* microbodies by isopycnic centrifugation in nycodenz as visualized with immuno-electron microscopy. *Biochem. Biophys. Acta*, **1245**, 215–220 (1995)
23. Nagotu S., Veenhuis M., van der Klei I.J.: *Divide et impera*: The dictum of peroxisomes. *Traffic*, **11**, 175–184 (2010)
24. Nijland J.G.: Kovalchuk A., van den Berg M.A., Bouvenberg R.A.L., Driessen A.J.: Expression of the transporter encoded by the *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 1415–1421 (2008)
25. Nuttall J.M., Motley A., Hettema E.H.: Peroxisome biogenesis recent advances. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **23**, 421–426 (2011)
26. Opaliński Ł., Kiel J. A., Homan T.G., Veenhuis M., van der Klei I.J.: *Penicillium chrysogenum* Pex/14/17p – a novel component of the peroxisomal membrane that is important for penicillin production. *FEBS J.* **277**, 3203–3218 (2010)
27. Öster L.M., Lester D.R., Terwisscha van Scheltinga A., Svenda M., van Lun M., Génèreux C., Andersson I.: Insights into cephamycin biosynthesis: the crystal structure of CmcI from *Streptomyces clavuligerus*. *J. Mol. Biol.* **358**, 546–558 (2006)
28. Perry R.J., Mast F.D., Rachubiński R.A.: Endoplasmic reticulum-associated secretory proteins Sec20p and Dsi1p are involved in peroxisome biogenesis. *Eukaryot. Cell*, **8**, 830–843 (2009)
29. Schmitt E.K., Hoff B., Kück U.: Regulation of cephalosporin biosynthesis. *Adv. Biochem. Biotechnol.* **88**, 1–43 (2004).
30. Tam Y.Y., Fagarasanu A., Fagarasanu M., Rachubiński R.A.: Pex3p initiates the formation of a peroxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 34933–34939 (2005)
31. Teixeira F., Ullán R.V., Guerra S.M., Garcia-Estrada C., Vaca I., Casqueiro J., Martin J.F.: The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is essential for cephalosporin production. *Biochem. J.* **418**, 113–124 (2009)
32. Ullán R.V., Casqueiro J., Bañuelos O., Fernández F.J., Gutiérrez S., Martin F.J.: A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* **277**, 46216–46225 (2002)
33. van de Kamp M., Driessen A.J., Konings W.N.: Compartmentalization and transport in β -lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **75**, 41–78 (1999)
34. van der Lende T.R., Breeuwer P., Abbe T., Konings W.N., Driessen A.J.: Assessment of the microbody luminal pH in the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta*. **1589**, 104–111 (2002)
35. Weber S.S., Bovenberg R.A., Driessen A.J.: Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. J.* **7**, 225–236 (2012)
36. Weber S.S., Polli F., Boer R., Bovenberg R.A., Driessen A.J.: Increased penicillin production in *Penicillium chrysogenum* strains via balanced overexpression of isopenicillin N acyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7107–7113 (2012)
37. Wu X.B., Fan K.Q., Wang Q.H., Yang K.Q.: C-terminus mutations of *Acremonium chrysogenum* deacetoxy/deacetylcephalosporin C synthase with improved activity toward penicillin analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**, 103–110 (2005)

Ewa Krzyżewska¹, Marta Książczyk², Anna Kędziora²,
Bożena Futoma-Kołoch², Gabriela Bugla-Płoskońska^{2*}

¹Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych,
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu
²Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego

Wpłynęło w kwietniu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 2. Oporność mikroorganizmów na biocydy. 3. Oporność bakterii na biocydy determinowana przez geny znajdujące się na plazmidzie. 4. Zmiana ultrastruktury składników osłon komórkowych, jako odpowiedź komórki bakterii na działanie biocydów. 4.1. Modyfikacje lipopolisacharydu bakterii Gram-ujemnych. 4.2. Modyfikacje białek błony zewnętrznej oraz pompy efflux jako główny system oporności na biocydy bakterii Gram-ujemnych. 5. Biofilm bakteryjny jako strategia ochronna przed działaniem substancji biobójczych. 6. Oporność krzyżowa bakterii na biocydy i antybiotyki. 7. Podsumowanie

Modifications of cell structure of microorganisms induced by biocides

Abstract: Interactions between bacterial cells and antimicrobial agents, including disinfectants, are still not well investigated and understood, especially in terms of bacterial insusceptibility to biocides. Facing increasing and deepening multidrug resistance phenomenon among pathogenic bacteria, disinfection is one of the most popular and effective non-antibiotic control and elimination method of pathogen dissemination. If disinfection is supposed to be an alternative solution to antibiotic therapy, it needs to be confirmed that multidrug resistance would not be replaced by an even more dangerous phenomenon, i.e. microbial resistance to biocides. Hence, it is essential to investigate this issue. Recently, there have been a lot of research about interactions between microorganisms and biocides, which is reflected in the numerous publications available in the Pub-Med database (649 from years 2009–2014). What is more, since 2013/2014 the BacMet database, which contains sequences and information about genes associated with microbial susceptibility to biocides, is available on-line. Better understanding of bacterial molecular response to biocides might reveal some unknown and important interactions.

1. Introduction. 2. Resistance to biocides. 3. Biocide resistance determined by genes contained on plasmids. 4. Changes of bacterial cell envelope in response to biocides. 4.1. Modification of bacterial lipopolysaccharides. 4.2. Modifications of outer membrane proteins and efflux pumps as the main system of bacterial resistance to biocides of Gram-negative bacteria. 5. Bacterial biofilm as a protective strategy against biocides. 6. Cross-resistance of bacteria to biocides and antibiotics. 7. Summary

Słowa kluczowe: biocydy, oporność bakterii, środki dezynfekcyjne

Key words: biocides, bacterial resistance, disinfectants

1. Wprowadzenie

Biocydy stanowią grupę związków chemicznych pochodzenia syntetycznego lub naturalnie występujących w przyrodzie, które są stosowane w zwalczaniu szkodliwych organizmów (bakterii chorobotwórczych, grzybów, pierwotniaków, gryzoni) [77]. Kontrola chemiczna mikroorganizmów jest powszechnie stosowana w poszczególnych sektorach przemysłu (spożywczym, chemicznym), zdrowia publicznego (szpitalach, gabinetach lekarskich i kosmetycznych), oraz życia codziennego (miejscach użyteczności publicznej, gospodarstwach domowych). Dezynfekcja to proces, w którym następuje redukcja liczby form wegetatywnych (bez form przetrwalnych) drobnoustrojów dezynfekowanej powierzchni lub przedmiotu do poziomu bezpiecznego dla użytkowników. Proces ten może być prowadzony metodami: fizycznymi (np. promieniowanie UV, tem-

peratura, para wodna), mechanicznymi (np. filtracja) lub chemicznymi (środki dezynfekcyjne) [36, 66, 77].

Środki dezynfekcyjne stanowią grupę związków chemicznych (tj. alkohole, aldehydy, kwasy organiczne, fenole, związki kationowe), które wykazują różną reaktywność i toksyczność względem mikroorganizmów. Komercyjnie dostępne środki dezynfekcyjne mogą zawierać w swoim składzie, jako substancje czynne jeden lub kilka związków chemicznych, takich jak: fenole, aldehydy, chlorowcopochodne i fluoropochodne, czwartorzędowe związki amoniowe (*Quaternary Ammonium Compounds*, QAC's), związki utleniające, czy metale ciężkie. Obecność kilku substancji czynnych w środkach dezynfekcyjnych zwiększa spektrum działania i skuteczność danego preparatu [46, 47]. Jednoznaczne określenie mechanizmu działania biocydów na komórki drobnoustrojów jest problematyczne biorąc pod uwagę ogromne zróżnicowanie związków chemicznych zali-

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; tel.: +48 71 3756 323; e-mail: gabriela.bugla-ploskonska@uwr.edu.pl

Tabela I

Związki chemiczne najczęściej stosowane w preparatach dezynfekcyjnych oraz ich mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego, na podstawie [15, 17, 69, 76]

Grupa chemiczna	Substancje aktywne	Mechanizm działania
Alkohole	etanol, izopropanol	denaturacja białek, uszkodzenie błony komórkowej
Aldehydy	glutaraldehyd, formaldehyd	wiązanie do grup aminowych białek, zaburzenie w funkcjonowaniu osłon komórkowych, zmiany w strukturze materiału genetycznego, hamowanie transportu komórkowego
Biguanidy	chlorheksydyna	zmiana przepuszczalności osłon komórkowych, denaturacja białek cytoplazmatycznych, wytrącanie kwasów nukleinowych
Fenole	fenol, krezol i ich pochodne	uszkodzenie błony cytoplazmatycznej, denaturacja białek, koagulacja cytoplazmy
Związki chloru	chloramina, podchloryn sodu, podchloryn wapnia	denaturacja białek, uszkodzenie materiału genetycznego
Związki jodu	jodyna, jodofory	denaturacja białek
Substancje utleniające	ozon, nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy	denaturacja białek, niszczenie struktury lipidów i kwasów nukleinowych
IV-rzędowe związki amoniowe	chlorek benzalkoniowy, chlorek benzetoniiowy	uszkodzenie osłon komórkowych, oddziaływanie z fosfolipidami błonowymi, denaturacja białek, niszczenie struktury kwasów nukleinowych, aktywacja enzymów autolitycznych

czanych do środków dezynfekcyjnych. Biocydy mogą działać zarówno bakteriostatycznie, jak i bakteriobójczo, co zależy przede wszystkim od stężenia roztworu roboczego danego preparatu [67]. W Tabeli I zamieszczono zestawienie związków chemicznych najczęściej stosowanych jako środki dezynfekcyjne, z zaznaczeniem ogólnych mechanizmów ich działania przeciwdrobnoustrojowego. Działanie bakteriobójcze środków dezynfekcyjnych jest niespecyficzne i skierowane na struktury, które odpowiadają za utrzymanie ogólnej integralności i funkcjonalności komórki. Elementami tymi są: ściana komórkowa, błona cytoplazmatyczna oraz cytoplazma wraz ze strukturami komórkowymi [14, 40, 47]. Biocydy zazwyczaj wchodzi w niespecyficzne oddziaływania chemiczne z poszczególnymi komponentami komórek mikroorganizmów. Na przykład glutaraldehyd lub srebro niespecyficznie reagują z resztami aminowymi lub tiolowymi białek bakteriacyjnych. W efekcie może nastąpić zaburzenie lub zahamowanie poszczególnych procesów metabolicznych bądź uszkodzenie struktur komórkowych [15].

Środki dezynfekcyjne dzieli się na dwie główne klasy: związki utleniające (*oxidizing agents*) nukleofilowe lub elektrofilowe i odpowiednio związki nieutleniające (*non-oxidizing agents*) [46]. Związki utleniające, np. nadtlenek wodoru, chlor i chlorowcopochodne, dwutlenek chloru, podchloryn sodu, kwas nadoctowy, ozon czy jodofory powodują utlenianie grup funkcyjnych poszczególnych składników budujących komórki mikroorganizmów. W wyniku tego procesu, dochodzi w szybkim tempie do wielu nieodwracalnych uszkodzeń, a w efekcie końcowym do eliminacji drobnoustrojów. Związki utleniające odznaczają się bardzo

dużą reaktywnością oraz bardzo szerokim spektrum działania. Wykazują aktywność względem praktycznie wszystkich grup mikroorganizmów: wegetatywnych komórek bakterii Gram-dodatnich (w tym prątków), jak i bakterii Gram-ujemnych, wirusów, grzybów, a nawet spor bakteriacyjnych. Chlor i jego pochodne stanowią powszechnie używane w przemyśle, jaki i gospodarstwach domowych środki dezynfekcyjne. Kwas podchlorynowy dyfunduje przez osłony powierzchniowe mikroorganizmów, a następnie na terenie cytoplazmy wchodzi w reakcje z innymi składnikami komórkowymi (białka, kwasy nukleinowe, lipidy) powodując ich utlenienie oraz hamując produkcję ATP zaburzając tym samym procesy oddychania komórkowego [19]. Podobne działanie, jak związki chloru, wykazuje ozon, który posiada wysoką aktywność biologiczną, a przy tym jest w niewielkim stopniu szkodliwy dla środowiska [50].

Do środków dezynfekcyjnych nieutleniających zalicza się np. czwartorzędowe związki amoniowe, biguanidyny, związki amfoteryczne, alkohole, aldehydy oraz fenol i jego pochodne. W ogólnym schemacie działania tej grupy związków następuje przenikanie danej substancji przez osłony komórkowe i jednocześnie dochodzi do zakłócenia przepuszczalności błony cytoplazmatycznej komórki mikroorganizmu, czego rezultatem może być wyciek drobnocząsteczkowych składników komórkowych do przestrzeni peryplazmatycznej, np. zasad azotowych i/lub jonów potasowych. Na tym etapie zostają zahamowane podziały komórek. Przy wystarczającym stężeniu środka dochodzi do koagulacji białek cytoplazmy i zablokowania podstawowych funkcji metabolicznych komórki mikroorganizmu, co doprowadza do jej śmierci [14, 47, 77].

2. Oporność mikroorganizmów na biocydy

Bakterie mogą nabywać oporność na środki dezynfekcyjne podobnie jak na antybiotyki i chemioterapeutyki. W kontroli rozprzestrzeniania się chorób infekcyjnych konieczne jest zbadanie związku pomiędzy lekoopornością mikroorganizmów, a ich opornością na biocydy. Oporność bakterii na biocydy jest zjawiskiem znanym i opisanym w literaturze. Schwaiger i wsp. [74] wykazali, że szczepy *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* izolowane zarówno od pacjentów hospitalizowanych, jak i z produktów spożywczych, gospodarstw hodowlanych, czy terenów rolniczych, cechowała znacznie zmniejszona wrażliwość na czwartorzędowe sole amoniowe. Narui [53] w swoich badaniach dowiódł, że metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) są odporne na kwas podchlorawy, chlorheksydynę oraz związki chloru. Stickler [78] z kolei opisał zmniejszoną wrażliwość na triklosan szczepów *Proteus mirabilis* izolowanych z cewników. Wiąże się z tym obawa, że mikroorganizmy mogą być niewrażliwe na biocydy nawet, jeśli te są stosowane w stężeniach zdefiniowanych przez producenta, jako aktywne przeciwdrobnoustrojowo. Jest to realne zagrożenie zdrowia publicznego, gdyż nieskuteczna dezynfekcja może być przyczyną zachorowań nawet o charakterze epidemicznym [24]. Dlatego ważne jest poznawanie mechanizmów oporności bakterii na środki dezynfekcyjne, gdyż może być to wykorzystane w projektowaniu nowych związków dezynfekcyjnych lub strategii i rozwiązań zaradczych, które będą zapobiegać generowaniu oporności bakterii na biocydy lub umożliwią przełamanie mechanizmów oporności.

W tym kontekście istotne są badania nad molekularnymi mechanizmami i uwarunkowaniami zmniejszonej wrażliwości drobnoustrojów na związki chemiczne stosowane w dezynfekcji. W ostatnich latach owstały liczne prace nad tym zagadnieniem, o czym świadczy znaczna liczba publikacji z lat 2009–2014, wynosząca 649 pozycji w bazie Pub-Med. Publikacje obejmują prace przeglądowe oraz badania eksperymentalne dotyczące wrażliwości mikroorganizmów na związki biobójcze, prowadzone w warunkach *in vitro* [7, 37, 51, 82, 85] oraz w miejscach praktycznego stosowania dezynfekcji chemicznej [54, 72, 74]. Badanie oporności biofilmów bakteryjnych względem biocydów jest istotne ze względu na powszechne występowanie tych form na terenie obszarów poddawanych intensywnym procesom dezynfekcji chemicznej. Szczególnie w ostatnich latach (2013–2014) liczne zespoły badawcze [10, 22, 29, 52, 55] skoncentrowały się nad badaniem wrażliwości mikroorganizmów żyjących w biofilmach (jako najpowszechniejszej formy występowania drobnoustrojów w środowisku zewnętrznym) na biocydy.

Badania nad opornością mikroorganizmów względem środków dezynfekcyjnych dotyczą nie tylko bakterii. Tung i wsp. [79] wykazali, że tak powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne, jak etanol i czwartorzędowe związki amoniowe, mają stosunkowo niską skuteczność w inaktywacji ludzkich norowirusów wywołujących ostre infekcje pokarmowe. Badane norowirusy wykazywały także zmniejszoną wrażliwość na działanie kwasu podchlorawego, szczególnie w porównaniu do mysiego norowirusa. Zaś ekspozycja ludzkiego wirusa brodawczaka HPV na 11 powszechnie dostępnych i stosowanych środków dezynfekcyjnych wykazała, że większość preparatów dezynfekcyjnych stosowanych w placówkach szpitalnych i gabinetach dentystycznych, a także środki o właściwościach potencjalnie sterylizujących, nie powodowały eliminacji wirusa HPV (za wyjątkiem pochodnych fenolu i środków zawierających związki srebra) [48].

Oporność na biocydy może stanowić stałą, charakterystyczną cechę danej grupy mikroorganizmów, tzw. naturalną oporność (*intrinsic resistance*). Charakteryzują się nią spory bakteryjne o złożonej, wielowarstwowej budowie osłon zewnętrznych oraz prątki (*Mycobacterium* spp.), posiadające kwasooporną ścianę komórkową [70]. Mikroorganizmy, naturalnie wrażliwe na biocydy mogą nabyć oporność na te substancje poprzez wykształcenie odpowiednich mechanizmów. Mechanizmy te mogą być uwarunkowane różnorodnymi czynnikami i powstawać jako konsekwencja:

- **zmian fenotypowych.** Ten typ oporności na biocydy manifestowany przez bakterie może znacząco zmieniać się pod wpływem takich bodźców jak: utrudniona dostępność składników odżywczych i tlenu, faza wzrostu, w jakiej znajdują się bakterie oraz występowanie mikroorganizmów w postaci biofilmów. Bakterie w odpowiedzi na czynniki stresowe wykazują wówczas zwiększoną oporność na różnego rodzaju związki przeciwdrobnoustrojowe, co wynika prawdopodobnie ze zmian w strukturze czy elementach składowych powierzchniowych osłon komórkowych, warunkujących zmniejszoną przepuszczalność dla związków toksycznych [27].

- **zmian indukowanych.** W odpowiedzi na stres selekcyjny, jakim jest ekspozycja bakterii zwłaszcza na niskie, subinhibitorowe stężenia biocydów może nastąpić wykształcenie mechanizmów warunkujących zmniejszoną wrażliwość na dane związki. Działanie biocydów na mikroorganizmy indukuje dwa podstawowe mechanizmy oporności: nadekspresję pomp efflux (głównie u bakterii Gram-ujemnych) oraz produkcję przez bakterie enzymów inaktywujących biocydy [26, 31].

- **zmian chromosomalnych.** Mutacje w obrębie genów kodujących miejsca docelowego działania biocydów w komórkach bakteryjnych powodują brak

wrażliwości takich komórek na dane związki. Także nadekspresja genów kodujących pompy efflux może być uwarunkowana mutacjami punktowymi, a nie tylko zmianami indukowanymi [28].

• **zmian plazmidowych (liczba, skład).** Bakterie mogą nabywać obcy materiał genetyczny wraz z ruchomymi elementami genetycznymi takimi jak plazmidy, które mogą zawierać m.in. geny oporności na związki przeciwdrobnoustrojowe. W konsekwencji może nastąpić horyzontalne rozprzestrzenianie się wśród populacji bakterii oporności związanej głównie z nadekspresją genów kodujących pompy efflux oraz genów kodujących enzymy inaktywujące biocydy [28, 25].

Stosowanie antybiotyków, chemioterapeutyków, czy biocydów może sprzyjać selekcji bakterii o fenotypie oporności. Pojawia się jednak niejednoznaczność w sprawie nazewnictwa patoadaptantów, które pod wpływem presji selekcyjnej środowiska uruchomiły mechanizmy umożliwiające przetrwanie niekorzystnych warunków (np. subinhibitorowych stężeń biocydów) w postaci molekularnych zmian, jakie zachodzą w obrębie komórki. Nie są to już w sposób oczywisty komórki macierzyste, a po usunięciu czynnika selekcyjnego mogą powrócić do formy wyjściowej. W odróżnieniu od komórek zmutowanych, w których nastąpiły genetyczne zmiany warunkujące trwałą cechę oporności, przyjęło się nazywać te formy adaptantami lub patoadaptantami. Niejednokrotnie jednak stosuje się te terminy zamiennie, opisując adaptanty również mutantami [2, 45].

W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania [21, 31, 32], których rezultaty wskazują na znaczącą rolę mechanizmów o podłożu genetycznym, w oporności bakterii na środki dezynfekcyjne. Na podstawie wyników dotychczasowych eksperymentów prowadzonych w warunkach *in vitro*, przypuszcza się, że ekspozycja bakterii na biocydy skutkuje zmianami na poziomie ekspresji genów. Przypuszczalnie konsekwencjami tego są wzrost oporności drobnoustrojów na biocydy, a także narastanie zjadliwości bakterii. Powyższe założenia zostały potwierdzone eksperymentami Wang i wsp. [80], w których populacje *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis poddawano działaniu związków chloru o właściwościach utleniających, a następnie określano zmiany w transkryptomie badanych szczepów za pomocą wybranych badań genetycznych (metody hybrydyzacji, ilościowy Real-Time PCR, mikromacierze DNA) w porównaniu do szczepów nie podlegających działaniu stresu oksydacyjnego. Pod wpływem subinhibitorowych stężeń związków chloru u szczepów *Salmonella* Enteritidis oraz *Salmonella* Typhimurium następowały zmiany w ekspresji wielu genów związanych z metabolizmem komórkowym i wirulencją. Do najbardziej istotnych zmian należały: wzrost ekspresji genów związanych z formowaniem klasteru Fe-S, biosynteza

niektórych aminokwasów (cysteiny) oraz obniżenie poziomu ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę lipopolisacharydu (LPS) [80]. Podobne rezultaty uzyskano dla szczepu *Escherichia coli* O157:H7, który wykazywał zwiększoną oporność na związki przeciwdrobnoustrojowe po ekspozycji na związki utleniające [81]. Działanie czwartorzędowymi związkami amoniowymi na populację *S. enterica*, spowodowało selekcję wariantów o zmniejszonej wrażliwości na biocydy jak i antybiotyki, co wynikało z nadekspresji genów kodujących pompy efflux [37]. Podobnie ekspozycja komórek *Listeria monocytogenes* na wybrane biocydy: nadtlenki, związki chloru i czwartorzędowe związki amoniowe, wpłynęła na zwiększenie poziomu ekspresji genów wirulencji badanych bakterii [39].

Na przełomie 2013 i 2014 roku stworzono i udostępniono bazę danych BacMet [57] zawierającą informacje o genach związanych z opornością mikroorganizmów względem biocydów, w tym także antybiotyków i chemioterapeutyków. W bazie BacMet zgromadzone są aktualnie sekwencje 704 genów związanych z opornością na biocydy a także na metale ciężkie, zweryfikowane na podstawie literatury naukowej oraz 40 556 sekwencji potencjalnych genów oporności na związki przeciwbakteryjne. Przy sekwencjach poszczególnych genów oporności znajdują się informacje o: charakterystyce molekularnej, funkcji danego genu oraz rodzaju oporności, jaki warunkuje [57].

W dalszej części niniejszej pracy przedstawiono molekularne mechanizmy oporności (stała cecha uwarunkowana genetycznie, determinująca brak wrażliwości bakterii na określoną substancję przeciwdrobnoustrojową) lub zmniejszonej wrażliwości (cecha będącą mechanizmem adaptacyjnym bakterii w odpowiedzi na działanie substancji przeciwdrobnoustrojowej o najczęściej charakterze zmian fenotypowych, fizjologicznych, które mogą zostać utracone przez bakterie po zaprzestaniu działania na nie czynnika stresującego) mikroorganizmów na biocydy.

3. Oporność bakterii na biocydy determinowana przez geny znajdujące się na plazmidzie

Zmniejszona wrażliwość na działanie biocydów może być nabyta przez bakterie poprzez zmiany genetyczne, obejmujące transfer czynników genetycznych warunkujących oporność (plazmidy, transpozony) oraz mutacje chromosomalnego lub plazmidowego DNA. Zazwyczaj, nabyta oporność na biocydy jest wynikiem takich mechanizmów jak: degradacja lub modyfikacja enzymatyczna biocydu, aktywny wyrzut biocydów z komórek bakteryjnych oraz stosunkowo rzadko spotykana zmiana miejsca docelowego dla działania biocydu [28].

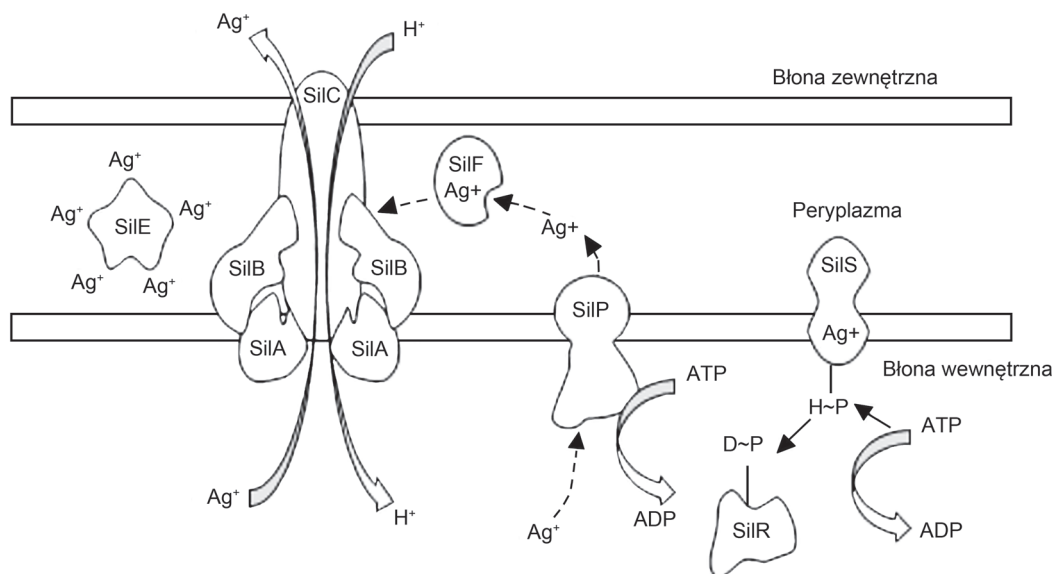
Oporność na biocydy może być uwarunkowana przez horyzontalny transfer genów (*Horizontal Gene Transfer*, HGT), głównie przez nabywanie plazmidów, na których są zlokalizowane geny oporności. Pierwsze doniesienia o tym, że geny chroniące przed szkodliwym działaniem biocydów mogą być zlokalizowane na plazmidach, dotyczyły oporności na metale ciężkie. Oporność względem metali ciężkich: miedzi, srebra, rtęci może rozprzestrzeniać się wśród bakterii poprzez HGT. Szczepy *E. coli* i *Pseudomonas syringae* stawały się odporne na miedź poprzez nabycie plazmidów zawierających geny oporności odpowiednio *pco* dla *E. coli* i *cop* dla *P. syringae*. Także dzikie szczepy *Enterococcus* spp. mogły nabywać plazmidy zawierające gen *trcB*, co warunkuje aktywny wyrzut miedzi z komórek tych ziarniaków [30]. Transfer genów odpowiedzialnych za nabywanie oporności na środki dezynfekcyjne może nastąpić poprzez rozprzestrzenianie się w populacji genów kodujących pompy efflux o szerokim spektrum substratowym zlokalizowanych na plazmidach. Geny *qacA* i *qacB* zostały zidentyfikowane odpowiednio na plazmidach wielooporności pSK1 i pSK23, których nabycie przez mikroorganizmy skutkuje wzrostem oporności na wiele antybiotyków oraz biocydów jak np. czwartorzędowe sole amoniowe czy metale ciężkie [28, 68]. Bakterie *E. coli* ze zidentyfikowanym plazmidem RP1 wykazują zmienioną strukturę LPS oraz zmniejszoną ekspresję genów poryn błony zewnętrznej, przez co szczepy te posiadają zwiększoną oporność na działanie fenolu, chlorheksydyny i cetrymidu [65].

Jony srebra posiadają szerokie spektrum działania zarówno wobec komórek bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, w tym zarówno gatunków tlenowych jak i beztlenowych [71]. Brady [3] w swoich badaniach dowiódł, że środki dezynfekcyjne zawierające srebro (*surface disinfectant spray*) skutecznie ograniczały wzrost *P. aeruginosa* oraz *S. aureus* po 30 minutach działania związku. Głównym miejscem oddziaływania srebra są komórkowe białka strukturalne i enzymatyczne, czyli białka pełniące podstawową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu mikroorganizmu. Antibakteryjna skuteczność srebra wynika z jego wiązania z grupą sulfydrolową (-SH) oraz innymi grupami funkcyjnymi wchodzącymi w skład komórkowych białek i kwasów nukleinowych [69]. W konsekwencji oddziaływania srebra z grupami funkcyjnymi dochodzi do denaturacji białek wchodzących w skład ważnych szlaków metabolicznych, białka tracą swą biologiczną aktywność, co prowadzi do śmierci komórki [5].

Jony srebra mają zdolność wiązania się ze ścianą komórkową bakterii, cytoplazmą, czy też otoczkami bakteryjnymi. Zmiany w strukturze osłon zewnętrznych komórki prowadzą do destabilizacji błony i wzrostu przepuszczalności. Srebro oddziałuje z grupami sul-

fhydrylowymi na powierzchni komórki drobnoustroju zastępując atomy wodoru, co prowadzi do powstania charakterystycznego wiązania S-Ag. W konsekwencji dochodzi do zablokowania łańcucha oddechowego i transportu elektronów, a siła protomotoryczna błony komórkowej zostaje zaburzona. W komórkach *E. coli* zaobserwowano zaburzenie siły protomotorycznej i śmierć komórki po dodaniu do hodowli bakteriowej AgNO_3 (20 μM) [73]. Jony Ag^+ po dostaniu się do wnętrza komórki są zdolne do oddziaływania z DNA. Srebro wchodzi w interakcje z zasadami azotowymi w DNA, w wyniku czego dochodzi do powstania formy skondensowanej kwasu nukleinowego oraz zahamowania procesu replikacji.

Pierwszy naukowy opis molekularnych podstaw oporności na srebro sporządzono na podstawie plazmidu pMG101, który wyizolowano z komórek szczepu *S. Typhimurium*. Plazmid pMG101 niosący geny oporności na antybiotyki (ampicylina, chloramfenikol, tetracyklina, streptomycyna) i metale ciężkie (srebro, rtęć) jest obecnie najbardziej poznaną strukturą warunkującą oporność bakterii na jony srebra. Badania nad przekazywaniem cechy oporności na srebro wykazały możliwość transferu plazmidu pMG101 do komórek *E. coli*, która po wbudowaniu plazmidu do własnego genomu uzyskuje cechę srebrooporności [58]. Po długotrwałej ekspozycji na wzrastające stężenia jonów Ag^+ dochodzi do zmniejszenia przepuszczalności osłon komórkowych, której przyczyną było utracenie głównych białek porynowych. Wśród doświadczalnie wygenerowanych mutantów zaobserwowano aktywnie działający system pomp efflux, który jest uznawany za jeden z podstawowych mechanizmów warunkujących oporność na metale ciężkie. Plazmid pMG101 jest determinantą genetyczną o długości około 180 kbp. Region warunkujący cechę srebrooporności sil-CFBA(ORF105aa) PRSE (Rys. 1) składa się z 9 genów, z których 8 genów oraz ich produkty białkowe scharakteryzowano na podstawie homologii do znanych mechanizmów oporności bakterii na srebro [49, 75]. Pierwszy gen *silE* koduje małe peryplazmatyczne białko, które jest zdolne do specyficznego wiązania jonów Ag^+ na powierzchni komórki, zanim wnikną do cytoplazmy. *SilE* wykazuje 47% podobieństwo do białka *PcoE* zaangażowanego w mechanizm oporności na miedź u *E. coli*. Białko *SilE* posiada w swojej budowie 10 reszt histydynowych zdolnych do wiązania pięciu jonów Ag^+ . Wysycenie wszystkich miejsc wiążących jonami Ag^+ prowadzi do znacznych zmian konformacyjnych (białko przyjmuje drugorzędową strukturę α -helisy) [49, 75]. Genom *silR* i *silS* przypisano funkcję regulacyjną, polegającą na kodowaniu dwuskładnikowego systemu przekazywania sygnałów. System ten składa się z błonowej kinazy histydynowej (*SilS*), która odbiera i przekazuje sygnał



Rys. 1. Mechanizm oporności bakterii na srebro, na podstawie [49, 75] (objaśnienia w tekście)

do regulatora transkrypcji, którym jest białko SilR [75]. Geny *silCBA* zaangażowane są w tworzenie kompleksu błonowego składającego się z trzech białek, który jest odpowiedzialny za wymianę kationowo-protonową działającą na zasadzie antyportu. Białka SilCBA należą do rodziny kationowych pomp efflux RND (*resistance nodulation and cell division*), które warunkują procesy oporności bakterii na substancje przeciwdrobnoustrojowe. System SilCBA wykazuje homologię do systemu wielolekooporności Acr u *E. coli*. Białko SilA jest dużym białkiem błonowym o długości 1048 aminokwasów. Składa się z domeny zakotwiczonej w błonie oraz domeny peryplazmatycznej, które razem tworzą kanał, jakim jony srebra przepływają z cytoplazmy do białka błony zewnętrznej SilC. Trzecie białko SilB pełni rolę łącznika, łączy białko SilA i SilC w funkcjonalną całość. Kompleks SilCBA tworzy system wyrzutu jonów srebra na zewnątrz komórki bez uwalniania ich do przestrzeni peryplazmatycznej [75]. Białko powstałe w wyniku ekspresji genu o długości 95 par zasad określa się jako SilF. Białko SilF w porównaniu z białkiem SilE wyróżnia się odmienną strukturą przestrzenną β -harmonijki oraz zdolnością do wiązania tylko jednego kationu srebra, dzięki obecności jednej reszty histydyny i dwóch reszt metioniny. Uważa się, że funkcją białka SilF jest transport jonów srebra od miejsca ich uwolnienia (białka SilP) bezpośrednio do chemiosmotycznej pompy SilCBA [49, 75]. W wyniku ekspresji ostatniego genu powstaje białko SilP, które pełni funkcję błonowej ATPazy typu P i jest odpowiedzialne za transport jonów Ag^+ z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej. Dla genu o długości 105 par zasad, znajdującego się pomiędzy genami *silA* i *silB* nie znaleziono dotychczas homologicznego białka i funkcja genu nie została do tej pory wyjaśniona [75].

4. Zmiana ultrastruktury składników osłon komórkowych, jako odpowiedź komórki bakterii na działanie biocydów

Jedną z najbardziej prawdopodobnych przyczyn zmniejszonej wrażliwości mikroorganizmów na działanie biocydów są modyfikacje w powierzchniowych osłonach komórkowych. Struktury powierzchniowe bakterii wchodzi w bezpośrednie interakcje ze środkami dezynfekcyjnymi. Modyfikacje w budowie osłon powierzchniowych komórek bakteryjnych mają na celu zmniejszenie przepuszczalności dla różnych związków toksycznych [28, 70]. W odpowiedzi na działanie biocydów komórki bakterii wykształcają mechanizmy zmieniające strukturę poszczególnych elementów osłon komórkowych.

4.1. Modyfikacje LPS bakterii Gram-ujemnych

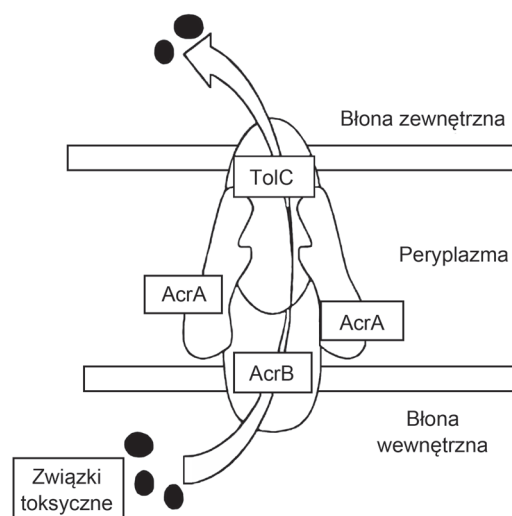
Zmiana struktury i poziomu ekspresji genów zaangażowanych w proces biosyntezy LPS wpływa znacząco na przepuszczalność osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych. Unikalny komponent ściany komórkowej bakterii, jakim jest LPS odpowiada za utrzymanie prawidłowej struktury i funkcji ściany komórkowej oraz za zmniejszoną wrażliwość bakterii na działanie biocydów. Nienaruszona warstwa LPS nadaje zewnętrznej powierzchni komórki bakteryjnej wypadkowy ładunek ujemny, co stanowi ochronę przed przenikaniem przez błonę zewnętrzną anionowych, hydrofobowych biocydów [43]. Mutanty *S. Typhimurium* o zmodyfikowanej długości O-swoistego łańcucha bocznego LPS wykazywały, zmienioną wrażliwość na działanie biocydów i antybiotyków w porównaniu do szczepu dzikiego. Warianty *S. Typhimurium* o LPS ze skróconym

O-swoistym łańcuchem bocznym lub całkowicie pozbawione tej części, tzw. szczepy szorstkie, charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na działanie antybiotyków oraz biocydów o charakterze hydrofobowym, w porównaniu do szczepów dzikich. Jednocześnie mutanty były odporne na związki kationowe [62, 63]. Gilbert i Brown [27] udowodnili w swoich badaniach, że wrażliwość szczepów *P. aeruginosa* na chlorowcopochodne fenolu zmniejsza się wraz ze wzrostem zawartości LPS w komórkach. Zdolność chlorofenolu do przechodzenia przez osłony powierzchniowe *P. aeruginosa* jest zależna od zmian w strukturze LPS badanych szczepów.

4.2. Modyfikacje białek błony zewnętrznej oraz pompy efflux jako główny system oporności na biocydy bakterii Gram-ujemnych

Pompy efflux stanowią kompleksy białkowe, które w sposób czynny usuwają substancje toksyczne z komórek bakterii, z nakładem energii wytworzonej przez komórkę. Pompy te należą do pięciu rodzin: MFS (*major facilitator superfamily*), SMR (*small multidrug resistance family*), ABC (*ATP-binding cassette family*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion family*), RND (*resistance nodulation division family*), zróżnicowanych pod względem budowy, swoistości substratowej, źródła wykorzystywanej energii i mechanizmu działania [60]. Pompy te zapewniają aktywny wyrzut z komórki bakterii szerokiego spektrum różnych związków, od metabolitów komórkowych po antybiotyki i środki dezynfekcyjne, dlatego też często zamiennie używa się nazwy pompy MDR (*multiple drug resistance*) [13]. Poszczególne pompy efflux są wyspecjalizowane w usuwaniu konkretnej substancji z komórki, lub mogą mieć szeroki zakres substratowy względem wielu różnych związków toksycznych dla bakterii. Białka tworzące pompy mogą być kodowane na chromosomie bakteryjnym, wtedy system efflux ma charakter wrodzony (efflux jest naturalną cechą m.in. pałeczek jelitowych z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp.) lub geny kodujące białka pomp są nabywane w procesie transformacji, koniugacji lub transdukcji [34].

Spośród wszystkich pomp efflux największe znaczenie w oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe i najszersze spektrum substratowe wykazują pompy RND bakterii Gram-ujemnych. Usuwają one z komórek mikroorganizmów zarówno antybiotyki, środki dezynfekcyjne, antyseptyczne jak i barwniki. Pompy RND charakteryzują się trójskładnikową strukturą, zbudowane są z białek wewnętrznej błony cytoplazmatycznej, białek peryplazmatycznych oraz białek błony zewnętrznej. Elementy te współpracując ze sobą usuwają określone substancje z cytoplazmy na zewnątrz komórki. Najlepiej poznany i zbadany jest system AcrAB-TolC,



Rys. 2. Budowa i mechanizm działania pompy białkowej bakterii Gram-ujemnych na przykładzie pompy AcrAB-TolC, na podstawie [4, 6, 34] (objaśnienia w tekście)

który jest jednym z najważniejszych mechanizmów oporności na związki toksyczne u pałeczek *Enterobacteriaceae* w tym u *E. coli* i *Salmonella* spp. Budowa pompy białkowej AcrAB-TolC jest przedstawiona schematycznie na rysunku 2.

AcrB jest białkiem transporterowym, zakotwiczoną w wewnętrznej błonie cytoplazmatycznej i otwierającym się do peryplazmy, rozpoznaje ono i wiąże substrat, a następnie umożliwia jego przedostanie się do przestrzeni peryplazmatycznej. TolC tworzy kanał przebijający błonę zewnętrzną i peryplazmę, umożliwiający wyrzut substratu na zewnątrz komórki. Zaś AcrA jest peryplazmatycznym białkiem łączącym AcrB i TolC [4, 6, 34]. Aktywność pomp AcrAB-TolC warunkuje przetrwanie bakterii jelitowych podczas ich ekspozycji na działanie soli żółciowych w żołądku. Ze względu na szerokie spektrum substratowe istnieje ryzyko, że pompy mogą usuwać „pomyłkowo” z komórek bakterii związki i substancje istotne dla prawidłowych procesów metabolicznych, jak pirogronian czy mleczan, dlatego też system efflux musi znajdować się pod odpowiednią kontrolą i regulacją komórkową [28, 34]. Przypuszcza się, że aktywność systemu efflux, a zwłaszcza pomp AcrAB-TolC bakterii Gram-ujemnych, jest regulowana przez globalne sygnały odpowiedzi stresowej. Aktywacja pomp białkowych następuje w odpowiedzi na zmiany warunków środowiskowych niszy zajmowanej przez mikroorganizmy, w wyniku ekspozycji ich na szkodliwe lub toksyczne substancje pochodzenia naturalnego jak i na związki stosowane w antybiotykoterapii lub dezynfekcji. W związku z tym pompy efflux nie są konstytutywnie ekspresjonowane przez drobnoustroje, lecz aktywacja tych białkowych kompleksów następuje w warunkach stresowych [28]. Ekspozycja mikroorganizmów na biocydy użyte

w niskich, subinhibitorowych stężeniach, szkodliwych dla bakterii indukuje ekspresję odpowiednich genów systemów efflux [13]. Przeprowadzane niezależnie od siebie liczne eksperymenty [4, 6, 34] wykazały, że nadekspresja pomp efflux AcrAB-TolC u *E. coli* i bakterii z rodzaju *Salmonella* spp. następuje po ekspozycji wyżej wymienionych bakterii na działanie subinhibitorowych stężeń biocydów. Karatzasi wsp. [38] wykazali, że ekspozycja *S. Typhimurium* na biocydy: triklosan i czwartorzędowe związki amoniowe powodowała nadekspresję pomp efflux, a także wydłużenie czasu podziałów komórkowych oraz zmniejszenie inwazyjności pałeczek *Salmonella* w stosunku do ludzkich komórek nabłonka jelita w porównaniu do szczepu dzikiego. Uzyskane warianty *S. Typhimurium* wykazywały stabilny fenotyp MDR o obniżonej wrażliwości na antybiotyki i biocydy. Randall i wsp. [61] po ekspozycji na środki dezynfekcyjne zawierające w swoim składzie aldehydy i substancje utleniające, wyizolowali warianty *S. Typhimurium* o fenotypie MDR tj. o zmniejszonej liczbie poryn w błonie zewnętrznej i nadekspresji pomp efflux. U pałeczek *E. coli* oraz *Salmonella* spp. regulacja ekspresji genów *acrAB* kodujących pompy efflux następuje z udziałem *locus mar*, który jest operonem pełniącym istotną rolę w wielolekooporności bakterii Gram-ujemnych [41]. Operon *mar* zlokalizowany jest na chromosomie wielu bakterii Gram-ujemnych, aktywowany bądź represjonowany w zależności od czynników i warunków oddziałujących na dane mikroorganizmy. Induktorami operonu *mar* są subinhibitorowe stężenia biocydów (np. czwartorzędowe sole amoniowe, triklosan), antybiotyków (np. tetracykliny, chloramfenikol) i wszelkich innych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Aktywacja genu *mar* zależy również od fazy wzrostu, w jakiej znajdują się mikroorganizmy. Zwiększona aktywność pomp efflux która jest spowodowana zwiększoną ekspresją genów *mar* występuje na początku stacjonarnej fazy wzrostu [44]. Ponadto nadekspresję genów kodujących białka pomp efflux, białek budujących pompy efflux przejawiają komórki bakterii formujących biofilm, a zwłaszcza te zlokalizowane w jego głębszych warstwach [80]. Szczepy *P. aeruginosa* posiadają pompy efflux MexAB, MexCD lub MexEF, które odpowiadają za usuwanie z komórki różnych leków (np. tetracyklin, fluorochinolonów, antybiotyków β -laktamowych) oraz wielu innych substancji o aktywności przeciwbakteryjnej [13, 34]. Chociaż systemy efflux są najlepiej poznane i scharakteryzowane dla bakterii Gram-ujemnych, białkowe pompy występują także u bakterii Gram-dodatnich, a zwłaszcza bakterii z rodzaju *Staphylococcus* spp. Największe znaczenie w zmniejszonej wrażliwości szczepów *S. aureus* względem biocydów mają pompy efflux QacA/B i Smr, należące do rodziny pomp SMR, których substratami są między innymi QAC's, biguanidyny,

diamidyny i barwniki [8]. Badania prowadzone nad klinicznymi szczepami *S. aureus* wykazywały obecność wśród testowanych gronkowców genów *qac* i *smr* kodujących odpowiednie pompy efflux. W poszczególnych eksperymentach stwierdzano różną prevalencję danych genów [86]. Kodowane chromosomalnie pompy MDR *S. aureus* warunkują oporność na biocydy, zarówno w wąszym jak i szerokim spektrum substratowym. Pompy NorA, NorB oraz MdeA i MepA rozpoznają, jako substraty czwartorzędowe sole amoniowe oraz barwniki, wypompowując je z komórek gronkowców i warunkując oporność bakterii na dane biocydy [35, 60].

Wielolekooporność wynikająca z nadekspresji systemu efflux może być konsekwencją wzrostu cytoplazmatycznego stężenia głównego, globalnego regulatora odpowiedzi stresowej *rpoS*. Podczas działania różnorodnych czynników stresowych włączana jest ekspresja systemu aktywnego wyrzutu związków toksycznych z komórki. Tym samym zachodzi selekcja wariantów szczepów o zwiększonej aktywności pomp białkowych tzw. *bulimic bacteria* [28].

5. Biofilm bakteryjny jako strategia ochronna przed działaniem substancji biobójczych

Adhezja do powierzchni nieożywionych i tworzenie błon biologicznych tzw. biofilmów jest najczęstszą odpowiedzią bakterii na nieprzyjazny habitat [83]. Biofilm jest wyjątkową, unikalną formą występowania żywych mikroorganizmów zarówno w środowisku nieożywionym, jak i wewnątrz organizmu gospodarza. Bakterie tworzące błony biologiczne znacznie różnią się pod wieloma względami od szczepów tego samego gatunku żyjących w postaci planktonicznej [56]. Biofilmy bakteryjne w porównaniu do komórek planktonicznych wykazują od 10 do nawet 1000 razy większą oporność wobec substancji przeciwdrobnoustrojowych [1]. Błony biologiczne charakteryzują się opornością zarówno na antybiotyki, jak i wysoce reaktywne związki dezynfekcyjne (np. isotionazol, czwartorzędowe sole amoniowe, związki halogenowe). Z tego względu eradycja biofilmów zarówno z organizmu pacjentów, jak i powierzchni nieożywionych jest istotnym problemem i wymaga zwłaszcza w drugim przypadku drastycznych metod mechanicznego usuwania z jednoczesnym użyciem biocydów o dużej aktywności biologicznej [1, 44].

Początkowo mikroorganizmy przylegają do danej powierzchni w sposób odwracalny [9]. Podczas procesu formowania się biofilmu, komórki bakterii przechodzą zmiany fizjologiczne, biochemiczne jak i genetyczne. Bakterie przylegają do danej powierzchni, następnie namnażają się tworząc mikrokolonie oraz produkują cząsteczki sygnałowe (zjawisko *quorum sensing*).

Komórki bakterii o zmienionym fenotypie lub/i genotypie w wyniku formowania się biofilmów tworzą mikrokolonie, zanurzone w zewnątrzkomórkowej macierzy (*extra cellular polymeric substances*, EPS) podzielonej siecią kanałów, zawierającej egzopolisacharydy oraz inne związki organiczne (m.in. białka, kwasy techojowe, kwasy nukleinowe, fosfolipidy) [16].

Naturalna oporność biofilmów na substancje toksyczne wynika prawdopodobnie z ich złożonej struktury, a zwłaszcza warunkowana jest przez egzopolisacharydowe matrix [1]. EPS jest gęstą elektronowo, żelowatą substancją, stanowiącą barierę fizyczną, utrudniającą dyfuzję biocydów, co uniemożliwia lub znacznie opóźnia ich dotarcie do komórek bakterii. Komórki bakteryjne zgrupowane w mikrokolonie i zlokalizowane w obrębie matrix, a zwłaszcza w głębszych warstwach biofilmów, są mniej wyeksponowane na działanie stosowanych związków bioaktywnych. Wykazano, że związki chloru cechuje znacznie spowolnione wnikanie w głąb biofilmów tworzonych jednocześnie przez *Klebsiella pneumoniae* i *P. aeruginosa*. Natomiast jednogatunkowy biofilm *P. aeruginosa* wykazuje zmniejszoną wrażliwość na ciprofloksacynę, w porównaniu do komórek tych bakterii żyjących w formie planktonicznej [12]. Matrix biofilmów może stanowić również barierę biochemiczną dla biocydów, jej składniki mogą wchodzić w reakcje chemiczne i neutralizować lub modyfikować właściwości określonych substancji bakteriobójczych [1, 26]. Obserwacje dowiodły [20, 33] iż, w wyniku ekspozycji biofilmów bakteryjnych na działanie kompleksów jodu, związków chloru oraz związków utleniających, związki te reagowały ze składnikami zewnątrzkomórkowego matrix biofilmów, co skutkowało spadkiem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Ponadto w macierzy biofilmów mogą znajdować się wydzielane przez komórki bakteryjne, enzymy powodujące inaktywację lub modyfikację środków dezynfekcyjnych, antybiotyków czy innych preparatów działających na biofilm [1, 42]. Sondossi i wsp. [76] wykazali aktywność liaz i dehydrogenaz formaldehydu w macierzy biofilmów *P. aeruginosa*, obecność tych enzymów powodowała wzrost oporności komórek bakterii na formaldehyd. W badaniach Cunha [11] udowodniono, że oporność biofilmów *P. aeruginosa* na antybiotyki β -laktamowe jest w znacznej mierze uwarunkowana obecnością w matrix zwiększonego stężenia β -laktamaz w porównaniu do komórek planktonicznych. Zespół Rodrigues i wsp. [64] przeprowadził eksperyment w którym określono wrażliwość biofilmów *L. monocytogenes* i *S. enterica* na wybrane środki dezynfekcyjne oraz oceniono zmiany jakie zaszły w komórkach bakterii po ekspozycji na biocydy, ze szczególnym odniesieniem do zmiany ekspresji genów związanych z odpowiedzią na czynniki stresowe i genów wirulencji. Zaobserwo-

wano, że praktycznie wszystkie z testowanych biocydów, nawet te użyte w wysokich stężeniach powodujących eliminację większości mikroorganizmów w biofilmie, indukowały zwiększoną ekspresję genów wirulencji w komórkach bakteryjnych, które przetrwały ekspozycję na dane związki.

6. Oporność krzyżowa bakterii na biocydy i antybiotyki

Biocydy mogą powodować selekcję wśród bakterii szczepów antybiotykoopornych jako skutek specyficznych jak i niespecyficznych zmian w budowie ich komórek. Niektóre z mechanizmów warunkujących zmniejszoną podatność mikroorganizmów na szkodliwe działanie biocydów są determinowane przez określone geny zlokalizowane na chromosomie lub plazmidzie. Transfer genów warunkujących oporność na biocydy może powodować jednocześnie przekazanie genów oporności na antybiotyki [23]. Geny *qacA/B* kodujące pompy efflux GacA i GacB występujące głównie u szczepów *S. aureus* i determinujące oporność na biocydy, są zlokalizowane na plazmidach wielolekooporności pSK1, noszących geny oporności na aminoglikozydy, trimetoprim i antybiotyki β -laktamowe [23]. Zaś geny *smr* kodujące pompy efflux-Smr, zapewniające brak wrażliwości gronkowców na biocydy kationowe są umiejscowione na plazmidzie z genami oporności na wankomycynę (pI. 1043), który jest identyfikowany u wysoce wankomycynoopornych, klinicznych szczepów *S. aureus* [84]. Selekcja genów oporności na biocydy może powodować równoczesną selekcję genów oporności na antybiotyki kodowane na tych samych czynnikach genetycznych. W ten sposób mikroorganizmy mogą nabywać jednoczesną oporność na środki dezynfekcyjne i antybiotyki (*co-resistance*).

Oporność krzyżowa (*cross-resistance*), polega na tym, że wytworzone mechanizmy oporności wobec określonej substancji szkodliwej warunkują równocześnie całkowity lub częściowy brak wrażliwości na inne substancje należące do tej samej lub zupełnie innej klasy związków chemicznych. *Micrococcus luteus* poddany działaniu dwutlenku chloru był oporny także na kwas nadoctowy i nadtlenek wodoru [59]. Pompy efflux zapewniają bakteriom oporność na szeroki zakres związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Poprzez zwiększoną ekspresję genów kodujących pompy następuje nabycie przez pierwotnie wrażliwe szczepy oporności zarówno na biocydy jak i antybiotyki. Nadekspresja genów dla białek pomp efflux NorA u szczepów *S. aureus* skutkuje równoczesną zmniejszoną wrażliwością tych mikroorganizmów na czwartorzędowe sole amoniowe, barwniki oraz opornością na chloramfenikol i fluorochinolony [59, 60].

7. Podsumowanie

W obliczu ciągle pogłębiającego się zjawiska lekooporności bakterii patogennych, zastrzane są metody kontroli i ograniczania rozprzestrzeniania się mikroorganizmów, a najczęściej stosowaną metodą jest dezynfekcja chemiczna z zastosowaniem preparatów biobójczych. Powszechność występowania szczepów bakteryjnych o zmniejszonej wrażliwości na środki dezynfekcyjne jest znaczna. Występowanie zjawiska oporności bakterii na biocydy ma charakter wieloczynnikowy. Mikroorganizmy wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych warunkujących zmniejszoną wrażliwość na związki biobójcze. Zmiana ultrastruktury składników osłon komórkowych oraz tworzenie błon biologicznych stanowi obok represji biosyntezy poryn, enzymatycznej inaktywacji biocydu oraz zmiany miejsc docelowego działania biocydu tylko część mechanizmów warunkujących oporność. W związku z tym niezwykle istotne wydają się być badania nad molekularnymi mechanizmami i uwarunkowaniami zmniejszonej wrażliwości drobnoustrojów na związki chemiczne stosowane w dezynfekcji. Zgłębianie tego zagadnienia może być pomocne w optymalizacji projektowania preparatów dezynfekcyjnych o dużej skuteczności.

„Dr Bożena Futoma-Kołoch i dr Anna Kędziora są stypendystkami Projektu „Akademia Rozwoju – kluczem wzmocnienia kadr polskiej gospodarki”, współfinansowana przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego BPZ.506.50.2012.MS”.

Piśmiennictwo

1. Araújo P., Lemos M., Mergulhão F., Melo L., Simões M.: Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms (w) Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, red. A. Mendez-Vilas, FORMATEX, Badajoz, 2011, s. 826–834
2. Baj J., Markiewicz Z.: *Biologia molekularna bakterii*. PWN, Warszawa, 2006
3. Brady M.J., Lisay C.M., Yurkovetskiy A.V., Sawan S.P.: Persistent silver disinfectant for the environmental control of pathogenic bacteria. *Am. J. Infect. Control*. **31**, 208–214 (2003)
4. Buckley A.M., Webber M.A., Cooles S., Randall L.P., La Ragione R.M., Woodward M.J., Piddock L.J.: The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* **8**, 847–856 (2006)
5. Bugla-Płoskońska G., Leszkiewicz A.: Biologiczna aktywność srebra i jego zastosowanie w medycynie. *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych*, **56**, 115–122 (2007)
6. Chojecka A., Jakubiec K., Jakimiak B., Röhm-Rodowald E., Kancłerski K.: Znaczenie zjawiska efflux jako mechanizmu oporności bakterii na substancje czynne środków dezynfekcyjnych. *Przegląd Epidemiologiczny*, **66**, 39–44 (2012)
7. Condell O., Iversen C., Cooney S., Power K.A., Walsh C., Burgess C., Fanning S.: Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3087–3097 (2012)
8. Costa S.S., Viverios M., Amaral L., Counto I.: Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol. J.* **7**, 59–71 (2013)
9. Costerton J.W.: Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **11**, 217–221 (1999)
10. Corcoran M., Morris D., De Lappe N., O'Connor J., Lalor P., Dockery P., Cormican M.: Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1507–1514 (2014)
11. Cunha B.A.: *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. *Semin. Respir. Infect.* **17**, 231–239 (2002)
12. Czaczyk K., Myszka K.: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia*, **76**, 40–52 (2007)
13. Daniels C., Ramos J.L.: Adaptive drug resistance mediated by root-nodulation-cell division efflux pumps. *J. Compl. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 32–36 (2009)
14. Denyer S.P., Stewart G.S.A.B.: Mechanisms of action of disinfectants. *Int. Biodeter. Biodegr.* **41**, 261–268 (1998)
15. Denyer S.P.: Mechanism of action of antibacterial biocides. *Int. Biodeter. Biodegr.* **36**, 227–245 (1995)
16. Donlan R.M.: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 881–890 (2002)
17. Dvorak G.: Disinfection 101. Center for Food Security and Public Health Veterinary Medicine. (2005), <http://www.cfsph.iastate.edu/Disinfection/Assets/Disinfection101.pdf> (22 lipca 2015 roku)
18. Dyrektywa 98/8/WE z dnia 16 lutego 1998 r. w sprawie wprowadzania do obrotu produktów biobójczych.
19. Eryilmaz M., Palabiyik I.M.: Hypochlorous acid-analytical methods and antimicrobial activity. *Trop. J. Pharm. Res.* **12**, 123–126 (2013)
20. Favero M.S., Bond W.W., Peterson N.J., Cook E.H.: Scanning electron microscopic observations of bacteria resistant to iodophor solutions (w) In Proceedings of the International Symposium on Povidone. University of Kentucky, Lexington, 1983, 158–166
21. Fernández-Fuentes M.A., Abriouel H., Ortega Morente E., Pérez Pulido R., Gálvez A.: Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria from organic foods. *Int. J. Food. Microbiol.* **17**, 49–56 (2014)
22. Fouladkhah A., Geornaras I., Sofos J.N.: Biofilm formation of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella* Typhimurium and newport and their inactivation by sanitizers. *J. Food. Sci.* **78**, 880–886 (2013)
23. Fraise A.P.: Biocide abuse and antimicrobial resistance – a cause for concern? *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 11–12 (2002)
24. Futoma-Kołoch B., Książczyk M., Maciag M., Bugla-Płoskońska G.: The risk of *Salmonella* resistance following exposure to common disinfectants: an emerging problem. *Biology International*, **53**, 54–66, (2013)
25. Futoma-Kołoch B., Książczyk M.: Oporność bakterii na środki dezynfekcyjne. *Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski*, **9–10**, 11–13 (2013)
26. Gilbert P., Allison D.G., McBain A.J.: Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.* **92**, 98–110 (2002)
27. Gilbert P., Brown M.R.: Influence of growth rate and nutrient limitation on the gross cellular composition of *Pseudomonas aeruginosa* and its resistance to 3- and 4-chlorophenol. *J. Bacteriol.* **133**, 1066–1072 (1978)
28. Gilbert P., McBain A. J.: Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 189–208 (2003)

29. Habimana O., Møretro T., Langsrud S., Vestby L.K., Nesse L.L., Heir E.: Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. *BMC Vet. Res.* **48**, 1–10 (2010)
30. Hasman H., Aarestrup F.M.: tcrB, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**, 1410–1416 (2002)
31. Hassan K.A., Jackson S.M., Penesyan A., Patching S.G., Tetu S.G., Eijkelkamp B.A., Brown M.H., Henderson P.J., Paulsen I.T.: Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 20254–20259 (2013)
32. Holder D., Berry D., Dai D., Raskin L., Xi C.: A dynamic and complex monochloramine stress response in *Escherichia coli* revealed by transcriptome analysis. *Water Res.* **47**, 4978–4985 (2014)
33. Huang C.T., Yu F.P., McFeters G.A., Stewart P.S.: Nonuniform-spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2252–2256 (1995)
34. Jarmuła A., Obłąk E., Wawrzycka D., Gutowicz J.: Oporność wielolekowa związana z aktywnym usuwaniem leków z komórek drobnoustrojów. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **65**, 216–227 (2011)
35. Kaatz G.W., Seo S.M.: Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2650–2655 (1995)
36. Kordus K., Rymarczyk-Kapuścik A.: Zastosowanie środków dezynfekcyjnych w gabinetach kosmetycznych w świetle obowiązującego prawa. *Estetol. Med. Kosmetol.* **1**, 27–33 (2011)
37. Karatzas K.A., Randall L.P., Webber M., Piddock L.J., Humphrey T.J., Woodward M.J., Coldham N.G.: Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1508–1516 (2008)
38. Karatzas K.A., Webber M.A., Jorgensen F., Woodward M.J., Piddock L.J., Humphrey T.J.: Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 947–955 (2007)
39. Kastbjerg V.G., Halberg-Larsen M., Gram L., Ingmer H.: Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 303–309 (2010)
40. Libudysz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna Tom 2. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności, PWN, Warszawa, 2009
41. Ma D., Cook D.N., Hearst J.N., Nikaido H.: Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **2**, 489–493 (1994)
42. Mah T.F., O'Toole G.A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**, 34–39 (2001)
43. Maillard J.Y.: Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 16–27 (2002)
44. Maira-Litran T., Allison D.G., Gilbert P.: Expression of the multiple resistance operon (mar) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 243–247 (2000)
45. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność, PWN, Warszawa, 2011
46. Marrs T.T., Ballantyne B.: Pesticide Toxicology and International Regulation, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, 2004
47. McDonnell G., Russell A.D.: Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Microbiol. Rev.* **12**, 147–179 (1999)
48. Meyers J., Ryndock E., Conway M.J., Meyers C., Robison R.: Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1546–1550 (2014)
49. Mijndonckx K., Leys N., Mahillon J., Silver S., Rob Van Houdt. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, **26**, 609–621 (2013)
50. Moore G., Griffith C., Peters A.: Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal. *J. Food. Prot.* **8**, 1015–1153 (2000)
51. Murdoch L.E., Maclean M., Endarko E., MacGregor S.J., Anderson J.G.: Bactericidal effects of 405 nm light exposure demonstrated by inactivation of *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, and *Mycobacterium* species in liquid suspensions and on exposed surfaces. *Sci. World J.* DOI: 10.1100/2012/137805 (2012)
52. Nakamura H., Takakura K., Sone Y., Itano Y., Nishikawa Y.: Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *J. Food. Prot.* **76**, 1179–1186 (2013)
53. Narui K., Takano M., Noguchi N., Sasatsu M.: Susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates to seven biocides. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 585–587 (2007)
54. Neo S.Y., Lim P.Y., Phua L.K., Khoo G.H., Kim S.J., Lee S.C., Yuk H.G.: Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid on reduction of natural microflora, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on mung bean sprouts. *Food Microbiol.* **36**, 475–480 (2013)
55. Nicholas R., Dunton P., Tatham A., Fielding L.: The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 555–564 (2013)
56. Olesiak P., Stępnia L.: Skuteczność wybranych związków dezynfekcyjnych. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, **15**, 41–50 (2012)
57. Pal C., Bengtsson-Palme J., Rensing C., Kristiansson E., Larsson D.G.J.: BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucl. Acids Res.* **42**, 737–743 (2014)
58. Percival S.L., Bowler P.G., Russell A.D.: Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* **60**, 1–7 (2005)
59. Piddock L.J.: Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 629–636 (2006)
60. Poole K.: Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 20–51 (2005)
61. Randall L.P., Bagnall M.C., Karatzas K.A., Coldham N.C., Piddock L.J., Woodward M.J.: Fitness and dissemination of disinfectant-selected multiple-antibiotic-resistant (MAR) strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 156–162 (2008)
62. Roantree R.J., Kuo, T.T., MacPhee D.G.: The effect of defined lipopolysaccharide core defects up on antibiotic resistances of *Salmonella* Typhimurium. *J. Gen. Microbiol.* **103**, 223–234 (1977)
63. Roantree R.J., Kuo, T.T., MacPhee D.G., Stocker, B.A.: The effect of various rough lesions in *Salmonella* Typhimurium upon sensitivity to penicillins. *Clin.* **17**, 157 (1969)
64. Rodrigues D., Cerca N., Teixeira P., Oliveira R., Ceri H., Acedo J.: *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Enteritidis biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. *Microb. Drug Resist.* **17**, 181–189 (2011)
65. Rossouw F.T., Rowbury R.J.: Effects of the resistance plasmid R124 on the level of the OmpF outer membrane protein and on the response of *Escherichia coli* to environmental agents. *J. Appl. Bacteriol.* **56**, 63–79 (1984)
66. Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 września 2003 r. w sprawie kryteriów i sposobów klasyfikacji substancji i preparatów chemicznych. Dziennik Ustaw 2003; nr 171: poz. 666.
67. Russell A.D., Russell N.J.: Biocides: activity, action and resistance. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **53**, 327–365 (1995)

68. Russell A.D.: Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 597–599 (2002)
69. Russel A.D., Hugo W.B.: Antimicrobial activity and action of silver. *Progr. Med. Chem.* **31**, 351–370 (1994)
70. Russell A.D.: Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *Int. Biodeter. Biodegr.* **36**, 247–265 (1995)
71. Sagripanti J.L.: Metal based formulation with high microbial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3157–3162 (1992)
72. Sekavec J.G., Moore W.T., Gillock E.T.: Chlorhexidine resistance in a Gram-negative bacterium isolated from an aquatic source. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **48**, 1829–1834 (2013)
73. Schreurs W.J., Rosenberg H.: Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **152**, 7–13 (1982)
74. Schwaiger K., Harms K.S., Bischoff M., Preikschat P., Mölle G., Bauer-Unkauf I., Lindorfer S., Thalhammer S., Bauer J., Hölzel C.S.: Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans-is there a link to antimicrobial resistance? *Front. Microbiol.* **5**, 1–24 (2014)
75. Silver S.: Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 341–353 (2003)
76. Sondossi M., Rossmore H.W., Wireman J.W.: Observation of resistance and cross-resistance to formaldehyde and a formaldehyde condensate biocide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Biodeter.* **21**, 105–106 (1985)
77. Stefańska J.: Substancje czynne środków dezynfekcyjnych – mechanizmy działania, oporność drobnoustrojów. *Mikrobiologia Medycyna*, **22**, 17–24 (2000)
78. Stickler D.J., Jones G.L.: Reduced susceptibility of *Proteus mirabilis* to triclosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 991–994 (2008)
79. Tung G., Macinga D., Arbogast J., Jaykus L.A.: Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human noroviruses and their surrogates. *J. Food Prot.* **76**, 1210–1217 (2013)
80. Wang S., Phillippy A.M., Deng K., Rui X., Li Z., Tortorello M.L., Zhang W.: Transcriptomic responses of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium to chlorine-based oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5013–5024 (2010)
81. Wang, S., Deng K., Zaremba S., Deng X, Lin C., Wang Q., Tortorello M.L., Zhang W.: Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 6110–6123 (2009)
82. Ward N.R., Wolfe R.L., Olson B.H.: Effect of pH, application technique, and chlorine-to-nitrogen ratio on disinfectant activity of inorganic chloramines with pure culture bacteria *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 508–514 (1984)
83. Watnick P., Kolter R.: Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **18**, 2675–2679 (2000)
84. Weigel L.M., Clewell D.B., Gill S.R., McDougal L.K., Flannagan S.E., Kolonay J.F., Shetty J., Killgore G.E., Tenover F.C.: Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, **302**, 1569–1571 (2003)
85. Whitehead R.N., Overton T.W., Kemp C.L., Webber M.A.: Exposure of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to high level biocide challenge can select multidrug resistant mutants in a single step. *PloS One*, **6**, 1–9 (2011)
86. Zmantar T., Kouidhi B., Miladi H.: Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res. Notes*, **4**, 453–461 (2011)

Alicja Namysłowska^{1*}, Agnieszka E. Laudy¹, Stefan Tyski^{1,2}

¹ Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

² Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków

Wpłynęło w czerwcu 2015 r.

1. Wstęp. 2. Oporność na antybiotyki β -laktamowe. 2.1. Enzymy CHDL. 2.2. Enzymy MBL. 2.3. Karbapenemazy należące do klasy A wg Amblera. 2.4. Nabyte enzymy ES β L hamowane przez inhibitory β -laktamaz. 2.5. Enzymy AmpC. 3. Oporność na antybiotyki inne niż β -laktamy. 3.1. Oporność na chinolony i fluorochinolony. 3.2. Oporność na aminoglikozydy. 3.3. Oporność na kolistynę. 4. Aktywne usuwanie antybiotyków z komórki bakteryjnej przy udziale pomp błonowych – mechanizm efflux. 4.1. System pomp RND. 4.2. Inne systemy pomp błonowych. 5. Kanały błonowe – pory. 6. Biofilm i zjawisko *quorum sensing*. 7. Podsumowanie

Acinetobacter baumannii: mechanisms of resistance to antibacterial agents

Abstract: *Acinetobacter baumannii* has become one of the most dangerous Gram-negative bacterial species, causing numerous infections over the last 20 years. *A. baumannii* is responsible for nosocomial ventilator-associated pneumonia (VAP), urinary tract infections, meningitis and bacteremia. Its remarkable ability to acquire resistance determinants against multiple antibiotics of different classes and to tolerate harsh environments resulted in the dissemination of multi-drug-resistant (MDR) strains. Diverse mechanisms of resistance limit therapeutic options and make the infections difficult to treat. The described resistance mechanisms include: production of β -lactamases, i.e. enzymes modifying structure of antibiotics, activity of efflux pumps, loss of membrane porins and formation of biofilm.

1. Introduction. 2. Resistance to β -lactams. 2.1. CHDLs. 2.2. MBLs. 2.3. Ambler class A carbapenemases. 2.4. Acquired ES β Ls inhibited by clavulanic acid. 2.5. AmpC enzymes. 3. Resistance to antibiotics other than β -lactams. 3.1. Resistance to quinolones and fluoroquinolones. 3.2. Resistance to aminoglycosides. 3.3. Resistance to colistin. 4. Efflux systems. 4.1. RND efflux system. 4.2. Other efflux systems. 5. Outer membrane porins. 6. Biofilm and *quorum sensing* process. 7. Summary

Słowa kluczowe: *Acinetobacter baumannii*, biofilm, karbapenemazy, oporność na antybiotyki

Key words: *Acinetobacter baumannii*, biofilm, carbapenemases, antibiotic resistance

1. Wstęp

W 2008 roku akronimem ESKAPE określono 6 gatunków bakterii najczęściej wywołujących poważne zakażenia szpitalne: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* sp. Określenie ESKAPE, oznaczające w języku angielskim ucieczkę („escape”), w tym przypadku oznacza działanie związków przeciwbakteryjnych na wymienione wyżej gatunki drobnoustrojów [11]. Należący do tej grupy *A. baumannii* okazał się w ostatnich 20 latach jednym z najbardziej alarmujących patogenów wywołujących zakażenia trudne w leczeniu.

Rodzaj *Acinetobacter*, należący do rodziny *Moraxellaceae*, obejmuje bakterie Gram-ujemne, pałeczki (w fazie logarytmicznego wzrostu), tlenowe, niefermentujące, niewybredne, niewykazujące zdolności ruchu (gr. *akinetos* – nieruchliwy). Rodzaj ten obejmuje co najmniej 41 gatunków, z których większość nie stanowi zagrożenia dla zdrowia człowieka. Gatunki *Acinetobacter calcoaceticus* (gatunek genowy 1), *A. baumannii* (gatunek genowy 2), *Acinetobacter pittii* (gatunek genowy 3),

Acinetobacter nosocomialis (gatunek genowy 13TU) oraz dwa rzadko występujące gatunki genowe „pomiędzy 1 i 3” i „blisko spokrewniony z 13TU” wykazują tak duże podobieństwo fenotypowe, że określa się je wspólnie jako *Acinetobacter calcoaceticus* – *A. baumannii*-complex [33]. Spośród wymienionych gatunków najbardziej istotny z klinicznego punktu widzenia jest *A. baumannii*. Posiada on wiele naturalnych mechanizmów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki, a ponadto wykazuje zdolność nabywania nowych determinantów oporności na związki przeciwdrobnoustrojowe.

Szczepy gatunku *A. baumannii* są naturalnie odporne na ampicylinę, amoksycylinę oraz jej połączenie z kwasem klawulanowym, cefazolinę, cefotaksym, ceftriakson, ertapenem, trimetoprim, fosfomicynę (wg European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST). Warto zauważyć, że u opisywanych pałeczek może występować wrażliwość na ampicylinę w połączeniu z sulbaktamem. Sulbaktam, jako jedyny z inhibitorów β -laktamaz, wykazuje aktywność wobec szczepów z gatunku *A. baumannii*. Do naturalnych mechanizmów oporności na antybiotyki β -laktamowe należy wytwarzanie β -laktamaz typu AmpC – ADC (*Acinetobacter*

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

derived cephalosporinase) [40] oraz β -laktamaz OXA-51-like [16]. Coraz częściej na całym świecie izoluje się wielolekooporne szczepy *A. baumannii* (MDRAB – multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*) [17, 28]. Determinanty oporności u szczepów MDRAB (wykazujących średnią bądź całkowitą oporność na co najmniej trzy klasy antybiotyków) są najczęściej umieszczone w obrębie integronów i transpozonów, co bardzo ułatwia ich rozprzestrzenianie się [86].

Leczenie zakażeń wywołanych wielolekoopornymi szczepami *A. baumannii* nie może ograniczać się do jednego antybiotyku lub chemioterapeutyku. Poszukuje się takich zestawień związków, które zapewnią skuteczną terapię, jednocześnie ograniczając ryzyko wytworzenia przez dany szczep mechanizmu oporności. Dotychczas wykazano działanie synergistyczne β -laktamów z aminoglikozydami i fluorochinolonami wobec szczepów *A. baumannii*. Jednak występująca coraz częściej u opisywanych pałeczek oporność na wymienione wyżej grupy antybiotyków i chemioterapeutyków, skłania do stosowania innych związków, najczęściej w terapii złożonej. W schematach leczenia zakażeń MDRAB, kluczowym lekiem są polimyksyny w zestawieniu z karbapenemami lub sulbaktamem lub tygecykliną lub ryfampicyną [109]. Wobec szczepów *A. baumannii* opornych na karbapenemy (imipenem i meropenem) proponowane są zestawienia kolistyny z tygecykliną lub cefoperazonem/sulbaktamem lub piperacyliną/tazobaktamem. W przypadku szpitalnych zapaleń płuc wywołanych przez szczepy odporne na imipenem i meropenem, zalecaną opcją terapeutyczną jest zestawienie kolistyny z ryfampicyną. Ryfampicina nie powinna być stosowana w monoterapii, ze względu na bardzo szybkie narastanie oporności na ten lek [56]. Dla nowego leku z grupy karbapenemów – doripenemu, wykazano działanie synergistyczne z polimyksyną B i ryfampicyną oraz z amikacyną. Efekt ten zaobserwowano wobec szczepów *A. baumannii* opornych na inne karbapenemy (imipenem i meropenem) [20]. Terapia złożona z wykorzystaniem doripenemu może zatem stanowić nową opcję leczenia zakażeń wywołanych szczepami *A. baumannii* opornymi na dotychczas stosowane karbapenemy. Innym antybiotykiem, wykazującym *in vitro* działanie synergistyczne z cefoperazonem/sulbaktamem lub meropenemem lub kolistyną, wobec wielolekoopornych szczepów *A. baumannii*, jest należąca do grupy tetracyklin minocyklina. Jednak, mimo obiecujących wyników aktywności minocykliny *in vitro*, niewiele jest danych klinicznych potwierdzających skuteczność terapii z wykorzystaniem tego antybiotyku w przypadku zakażeń szczepami *A. baumannii* [109].

Metodami wykorzystywanymi do genotypowania szczepów klinicznych *A. baumannii* są: analiza makrorestrykcyjna fragmentów chromosomalnego DNA

po ich elektroforezie w zmiennym polu elektrycznym – REA-PFGE (restriction enzyme analysis pulsed field gel electrophoresis), traktowana jako „złoty standard” w badaniu podobieństwa genetycznego szczepów bakterii, reakcja PCR sekwencji powtarzalnych Rep-PCR (repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR) oraz MLST (multilocus sequence typing), polegająca na sekwencjonowaniu fragmentów wybranych genów i ustaleniu typu sekwencyjnego, który identyfikuje się z wykorzystaniem internetowej bazy danych. Metoda Rep-PCR służy również do określania przynależności badanego szczepu *A. baumannii* do danego klonu europejskiego I, II bądź III.

Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* uważane są za wszechobecne. Szczepy *A. baumannii* izoluje się z próbek gleby, wód powierzchniowych i innych próbek środowiskowych. Wykrywa się także obecność tych pałeczek na ludzkiej skórze i w kale [46]. Był to najczęściej izolowany drobnoustrój z ran żołnierzy walczących na wojnie w Iraku i Afganistanie, występował w ranach osób poszkodowanych w trzęsieniu ziemi w Chinach i w wyniku tsunami z 2006 roku [71]. Co ciekawe, pałeczki z gatunku *A. baumannii* wykryto u wszy ludzkich pochodzących od ludzi bezdomnych z Francji [46]. Te pasożytnicze owady mogą stanowić zatem ważny rezerwuuar opisywanych bakterii.

Pałeczki z gatunku *A. baumannii* są patogenami oportunistycznymi. Stwarzają ogromne ryzyko dla pacjentów, szczególnie leczonych na oddziałach intensywnej terapii, przewlekłe chorych, z osłabionym układem odpornościowym. Bakterie te są przyczyną zapaleń płuc typu VAP (ventilator-associated pneumonia), zakażeń dróg moczowych, krwi, centralnego układu nerwowego, miejsca operowanego, oczu, także skomplikowanych zakażeń tkanek miękkich i skóry [46]. Pacjenci, którzy przebyli zakażenie bakteryjne o innej etiologii, w wyniku którego przyjmowali antybiotyki w przeciągu 90 dni, są szczególnie narażeni na zakażenie *A. baumannii*. Mechaniczna wentylacja czy założenie cewnika urologicznego stanowią dodatkowe zagrożenie, wynikające ze zdolności pałeczki do wytwarzania biofilmu [59].

2. Oporność na antybiotyki β -laktamowe

Karbapenemy, należące do grupy antybiotyków β -laktamowych, uważa się za leki z wyboru w przypadku zakażeń wywołanych przez *A. baumannii*. Nadużywanie leków z tej grupy w ostatnich dwóch dekadach spowodowało wytworzenie nowych mechanizmów oporności wśród opisywanych pałeczek. U szczepów *A. baumannii* wykazujących całkowitą oporność na karbapenemy, zwykle wykrywa się współdziałanie kilku różnych mechanizmów oporności, przede wszystkim

wytwarzanie karbapenemaz [97], a ponadto obniżoną u pałeczek *Acinetobacter* przepuszczalność błony zewnętrznej wynikającą z utraty porów [30] oraz nadekspresję systemów pomp usuwających antybiotyki z komórek bakteryjnych – mechanizm efflux [21]. W tabeli I zestawiono β -laktamazy wytwarzane przez *A. baumannii*. Bakterie te wytwarzają karbapenemazy należące do klas A, B, C i D wg Amblera [5], z których najczęściej występują u tych szczepów enzymy klasy D, czyli enzymy CHDL (carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases). Enzymy klasy B, metalo- β -laktamazy MBL (metallo- β -lactamase) występują u *A. baumannii* rzadziej niż CHDL. Natomiast należące do klasy A enzymy KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) stanowią największe zagrożenie dla osób w przypadku zakażenia szczepami KPC+, ze względu na zakres substratowy tych enzymów, obejmujący wszystkie antybiotyki β -laktamowe oraz zlokalizowanie genów je kodujących w ruchomych elementach genetycznych. Enzymy klasy C występujące u *A. baumannii* to naturalne cefalosporiny, jedynie enzym ADC-68, ma zdolność do hydrolizy karbapenemów [42].

2.1. Enzymy CHDL

Każdy szczep *A. baumannii* posiada w chromosomie gen kodujący enzym CHDL z grupy OXA-51-like. β -laktamazy te posiadają niską aktywność w stosunku do karbapenemów. Jednakże, gdy gen *bla*_{OXA-51} poprzedza sekwencja insercyjna *ISAbal* lub *ISAb9*, zawierająca sekwencję silnego promotora, dochodzi do nadekspresji genu, zdolność do hydrolizy karbapenemów wzrasta i szczep *A. baumannii* staje się średnio wrażliwy na tę grupę antybiotyków [82].

U szczepów z gatunku *A. baumannii* wykazano obecność pięciu grup nabytych oksacylinaz CHDL: OXA-23-like [100], OXA-40-like [63], OXA-58-like [79], OXA-143-like [38], OXA-235-like [37]. Te enzymy CHDL, podobnie jak OXA-51-like, posiadają słabą aktywność karbapenemaz. Nie wykazują także znaczącej aktywności wobec cefalosporyn o szerokim zakresie substratowym. Do wykształcenia się oporności na wysokie stężenia karbapenemów u szczepu *A. baumannii* wytwarzającego powyższe enzymy CHDL, potrzebna jest jednoczesna nadekspresja systemów pomp typu efflux i/lub zmniejszona przepuszczalność błony zewnętrznej. Ponadto, ekspresja genów *bla*_{OXA} kodujących β -laktamazy CHDL może być regulowana przez sekwencje insercyjne (*ISAbal*, *ISAb2*, *ISAb3*, *ISAb18*) [83], które pełniąc rolę silnych promotorów, w efekcie nadają enzymowi aktywność karbapenemazy [108].

Pierwszy enzym CHDL wykryty u *A. baumannii* to OXA-23 (nazwany początkowo ARI-1, *Acinetobacter* resistant to imipenem) [100]. Enzym kodowany

był przez gen zlokalizowany w plazmidzie szczepu izolowanego w Szkocji. Grupa OXA-23 to najbardziej rozpowszechnione enzymy CHDL wśród pałeczek *A. baumannii* na świecie. Opisano występowanie szczepów wytwarzających te enzymy w wielu krajach: Polsce, Chorwacji, Francji, Grecji, Rumunii, Włoszech, Hiszpanii, Turcji, Niemiec, Bułgarii, Egipcie, Algierii, Tunezji, Izraelu, Tajwanie, Chinach, Korei Południowej, Singapurze, Stanach Zjednoczonych, Kolumbii, Brazylii, Australii [25, 56, 70]. Badania Mugnier i wsp. [65] wykazały obecność genów *bla*_{OXA-23} u *A. baumannii* poprzedzonych sekwencją *ISAbal*, w transpozonach Tn2006, Tn2007 i Tn2008. Wykazano, iż w szczepach klinicznych *A. baumannii* transpozon Tn2006 zawierający gen *bla*_{OXA-23} zlokalizowany był w chromosomie lub plazmidzie, co może znacząco ułatwić rozprzestrzenianie się tych genów. Do podgrupy enzymów OXA-23 zalicza się także OXA-27 [2] oraz OXA-49 [82]. Gen *bla*_{OXA-27} zidentyfikowano u opornego na karbapenemy szczepu *A. baumannii* wyizolowanego w Singapurze. W 2014 roku opublikowano pracę, w której opisano nowy enzym z rodziny OXA-23 i był to OXA-239 [104]. Szczepy wytwarzające OXA-239 izolowano w Meksyku w 2010 roku. Gen *bla*_{OXA-239} był poprzedzony sekwencją insercyjną *ISAbal*.

Do innej grupy nabytych przez *A. baumannii* karbapenemaz CHDL należą enzymy OXA-40-like (nazywane także OXA-24-like). Są one mniej rozpowszechnione niż OXA-23-like. Geny *bla*_{OXA-40} wykryto u szczepów *A. baumannii* zarówno w chromosomie, jak i w plazmidach [82]. Enzymy OXA-40 wytwarzały szczepy izolowane z Półwyspu Iberyjskiego [63], Bułgarii [106], Francji [36], Stanów Zjednoczonych [56]. Do grupy OXA-40-like należą także enzymy: OXA-25, OXA-26 [2] oraz OXA-72 [98]. Enzym OXA-25 wytwarzał szczep *A. baumannii* izolowany w Hiszpanii, a enzym OXA-26 szczep pochodzący z Belgii [2]. Lokalizacja genów kodujących oba enzymy nie została określona. Enzym OXA-72 wykryto u szczepów *A. baumannii* z Tajwanu [50], Kolumbii [98], Japonii, Brazylii, Chorwacji, Litwy [86]. Gen *bla*_{OXA-72} zlokalizowany był za każdym razem w plazmidach. Obecność genu *bla*_{OXA-72} warunkowała u szczepów *A. baumannii* wzrost wartości MIC sulbaktamu (16 mg/l), imipenemu i meropenemu (32 mg/l), ampicyliny (1024 mg/l), tykarcyliny (> 1024 mg/l) [38, 50].

Enzym OXA-58 razem z OXA-96 [48], OXA-97 [78] i OXA-164 [39] tworzą kolejną grupę enzymów CHDL. Gen kodujący enzym OXA-58, pierwszy raz został wykryty u szczepu MDRAB wyizolowanego we Francji [79]. Następnie opisywano występowanie szczepów wytwarzających ten enzym w Hiszpanii, we Włoszech, Belgii, Turcji, Grecji, Austrii, Wielkiej Brytanii [46], a także w Australii, Stanach Zjednoczonych, Kuwejcie, Pakistanie, Chinach [31] i w krajach

Tabela I
Najbardziej istotne β -laktamazy wytwarzane przez szczepy *A. baumannii*

Klasa β -laktamaz wg Amblera [5]	Rodzina β -laktamaz	Enzym	Karba-penemaza	Lokalizacja genu	Piśmien-nictwo
A	ES β L	KPC-2	+	Chromosom	[93]
		KPC-3			
		KPC-4			
		KPC-10			
		GES-11	+	Plazmid	[17]
		GES-14	+	Plazmid	[7]
		GES-12	–	Plazmid	[7]
		GES-22	–	?	[12]
		PER-1	–	Transpozon Tn1213	[77]
		PER-2		?	[15]
		PER-7		Chromosom	[10]
		VEB-1	–	Integron klasy I, chromosom	[80]
		CARB-10	–	Plazmid	[85]
B	MBL	IMP-1	+	Integron klasy I	[53]
		IMP-2		Integron klasy I	[92]
		IMP-4		Integron klasy I	[48]
		IMP-5		Integron klasy I	[23]
		IMP-6		Integron klasy I	[32]
		IMP-8		Integron klasy I	[110]
		IMP-11		Integron klasy I	[112]
		IMP-19		Integron klasy I	
		VIM-1	+	Integron klasy I	[107]
		VIM-2		Integron klasy I	[113]
		VIM-4		?	[29]
		VIM-6		?	[86]
		VIM-11		Integron klasy I	
		SIM-1		Integron klasy I	[54]
		NDM-1		Transpozon Tn125	[9]
		NDM-2			[43]
		TMB-1		Integron klasy I	[45]
C	cefalosporyny	ADC-33	–	Chromosom	[95]
		ADC-56			[105]
		ADC-68	+		[42]
D	oksacyliny	OXA-23	+	Chromosom i plazmid	[65]
		OXA-27		?	[2]
		OXA-49		?	[82]
		OXA-239		?	[104]
		OXA-40		Chromosom i plazmid	[82]
		OXA-25		?	[2]
		OXA-26		Plazmid	[98]
		OXA-72			
		OXA-58		Plazmid	[79]
		OXA-96			[48]
		OXA-97			[78]
		OXA-164		?	[39]
		OXA-143		Plazmid	[38]
		OXA-182			[47]
		OXA-235		Chromosom i plazmid	[37]
		OXA-236			
		OXA-237		Plazmid	

„+” – enzym posiada aktywność karbapenemazy; „–” – enzym nie posiada aktywności karbapenemazy; „?” – brak danych

Ameryki Południowej: Argentynie [46], Wenezueli [99], Chile [73]. Gen *bla*_{OXA-58} znajdował się w plazmidach. Enzym OXA-58 wykazuje słabą aktywność karbapenemaz, lecz w przypadku obecności sekwencji insercyjnych IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3*, IS*18* poziom oporności na karbapenemy szczepów wytwarzających OXA-58 znacznie wzrasta [83]. Gen *bla*_{OXA-96} wykryto u szczepu *A. baumannii* wyizolowanego w Singapurze [48], a gen *bla*_{OXA-97} u szczepu z Tunezji [78].

W 2009 roku opisano nowy enzym CHDL występujący u *A. baumannii* – OXA-143 [38]. Szczep kliniczny, u którego wykryto OXA-143, wyizolowano w Brazylii. Enzym wykazuje 88% podobieństwa sekwencji aminokwasowej z OXA-40, 63% z OXA-23 i 52% z OXA-58. Gen *bla*_{OXA-143} zlokalizowany był w plazmidzie, w którym jednak nie wykryto obecności integronów i sekwencji insercyjnych [38]. Zakres substratowy OXA-143 obejmuje penicyliny oraz karbapenemy, bez znacznej aktywności wobec cefalosporyn III i IV generacji. W 2010 roku badacze z Korei Południowej opisali inny enzym CHDL, OXA-182, wykazujący 93% podobieństwa sekwencji aminokwasowej z OXA-143 i 89% z OXA-40. Zaliczono go do grupy OXA-143-like. Warto zaznaczyć, że szczep wytwarzający ten enzym wyizolowano już w 2002 roku [47]. Gen *bla*_{OXA-182} zlokalizowany był w plazmidzie. Wartość MIC imipenemu u pięciu z sześciu badanych szczepów *A. baumannii* posiadających *bla*_{OXA-182} wynosiła powyżej 32 µg/ml [55].

Enzymy OXA-235, OXA-236, OXA-237 stanowią podgrupę β-laktamaz typu CHDL nazwaną OXA-235-like [37]. Enzymy te wykryto u 9 szczepów wyizolowanych w Stanach Zjednoczonych i jednego szczepu z Meksyku. U 8 szczepów występował gen *bla*_{OXA-235}, natomiast *bla*_{OXA-236} i *bla*_{OXA-237} wykryto u pozostałych dwóch badanych izolatów. Sekwencja aminokwasowa tych karbapenemaz wykazywała 85% podobieństwa z sekwencją OXA-134, 54–57% podobieństwa z OXA-23, OXA-24, OXA-58 i OXA-143, oraz 56% podobieństwa z sekwencją OXA-51 [37]. Geny *bla*_{OXA-235} zlokalizowane były w chromosomie i/lub plazmidzie, podobnie jak *bla*_{OXA-236}, natomiast *bla*_{OXA-237} występował tylko w plazmidzie. Geny wszystkich trzech enzymów należących do tej grupy były oflankowane sekwencjami IS*Aba1*. Enzymy OXA-235-like hydrolizują penicyliny i karbapenemy, nie wykazują aktywności wobec cefalosporyn III i IV generacji [37].

2.2. Enzymy MBL

Metallo-β-laktamazy posiadają w swoim centrum aktywnym jon metalu dwuwartościowego. Ich zakres substratowy obejmuje wszystkie antybiotyki β-laktamowe za wyjątkiem monobaktamów, a ich aktywność nie jest hamowana przez inhibitory β-laktamaz, jakimi są kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam.

Występują one u szczepów *A. baumannii* znacznie rzadziej niż β-laktamazy serynowe. Obecnie opisano pięć rodzin enzymów MBL występujących u pałeczek *A. baumannii*: IMP (imipenem β-lactamase), VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase) [107], SIM (Seoul imipenemase) [54], NDM (New Delhi metallo-β-lactamase) [44] oraz TMB (Tripoli metallo-β-lactamase) [45].

W obrębie dużej rodziny enzymów IMP, u *A. baumannii* opisano występowanie dziewięciu z nich. Metaloenzym IMP-1 wykryto u szczepów *A. baumannii* wyizolowanych we Włoszech, Japonii [86], Korei Południowej [53], Indiach, Tajwanie i Kuwejcie [86]. Enzym IMP-2 wytwarzały szczepy z Włoch [92] i Japonii [86]. Enzym IMP-4 wykryto u szczepów *A. baumannii* wyizolowanych w Hong Kongu, Singapurze i Australii [18, 48, 86], IMP-5 w Portugalii [23], IMP-6 w Brazylii [32], a IMP-8 w Chinach [110]. Występowanie β-laktamaz IMP-11 i IMP-19 opisano w Japonii [112], IMP-14 w Tajlandii [86]. Geny kodujące enzymy IMP zlokalizowane były w obrębie integronów klasy I.

Pierwszy enzym typu VIM wykryto i opisano u szczepu z gatunku *A. baumannii* wyizolowanego w Korei Południowej [113]. Był to enzym VIM-2. Następnie opisano wytwarzanie tego enzymu przez szczep *A. baumannii* w Kuwejcie [86]. Gen *bla*_{VIM-2} zlokalizowany był w obrębie integronu klasy I. Kolejno wykrywano u szczepów *A. baumannii* enzymy: VIM-1 w Grecji [107], VIM-4 we Włoszech [60], VIM-6 w Indiach [86] i VIM-11 w Tajwanie [86]. Geny kodujące metaloenzymy VIM-1 i VIM-11 zlokalizowane były w obrębie integronów klasy I. Warto zauważyć, że w Polsce również wykryto u *A. baumannii* enzym z rodziny VIM, nie określono jednak jego sekwencji [111].

Enzym SIM-1 jest jedyną β-laktamazą z rodziny SIM. Dotychczas opisano jej występowanie jedynie u szczepów *A. baumannii* wyizolowanych w Korei Południowej [54]. SIM-1 wykazuje największe podobieństwo do sekwencji aminokwasowej enzymów z rodziny IMP: do IMP-12 (69%) i do IMP-9 (64%). Gen *bla*_{SIM-1} zlokalizowany był w obrębie integronu klasy I, gdzie stanowił pierwszą kasetę genową. Izolaty wytwarzające SIM-1 wykazywały względnie niskie wartości MIC imipenemu i meropenemu (dla obu antybiotyków 8–16 µg/ml) i posiadały fenotyp szczepów MDR [54]. Zakres substratowy tego enzymu obejmuje penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy [54].

Szczepy *A. baumannii* wytwarzające metallo-β-laktamazę NDM-1 są coraz częściej izolowane w różnych częściach świata. Enzym, początkowo zidentyfikowany u *K. pneumoniae*, obecnie wykrywany jest u wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych. U szczepów *A. baumannii* enzym NDM-1 wykryto w Europie: w Niemczech, Szwajcarii, Francji, Słowenii [9], Słowacji [49], w Afryce wschodniej [90], Algierii, Libanie

– gdzie izolowano szczepy od uchodźców z Syrii [87], także w Ameryce Południowej w Brazylii [76], w Azji w Chinach [114], Japonii [68] oraz w Indiach [44], gdzie wyizolowany był po raz pierwszy. W 2011 opisano szczep *A. baumannii* wytwarzający enzym NDM-2 (różniący się od NDM-1 w sekwencji aminokwasowej obecnością alaniny zamiast proliny w pozycji 28). Szczep wytwarzający ten enzym był wyizolowany od pacjenta narodowości niemieckiej, hospitalizowanego w Egipcie [43]. Szczepy *A. baumannii* wytwarzające enzym NDM-2 wyizolowano także w Izraelu i Zjednoczonych Emiratach Arabskich. Geny kodujące enzymy z grupy NDM, oflankowane z dwóch stron dwiema kopiami sekwencji insercyjnej IS*Aba125* zawierającej sekwencję promotorową, zlokalizowano w obrębie transpozonu Tn*125* [9]. Enzym NDM-1 może być kodowany zarówno chromosomalnie jak i plazmidowo, natomiast gen kodujący enzym NDM-2 występował dotychczas u szczepów *A. baumannii* tylko w chromosomie [86].

W kwietniu 2014 roku zespół badaczy z Japonii opisał szczep *A. baumannii* wytwarzający metalo- β -laktamazę z rodziny TMB [45]. W zakres substratowy tych enzymów wchodzi wszystkie antybiotyki β -laktamowe, z wyłączeniem imipenemu. Z tego względu fenotyp taki nazywany jest paradoksalnym. Gen *bla*_{TMB-1} zlokalizowano w obrębie integronu klasy I. Wytwarzanie enzymu TMB-2 wykryto w Japonii, u innych gatunków z rodzaju *Acinetobacter*: *A. pittii* i *Acinetobacter* gatunek genowy 14BJ, lecz nie u *A. baumannii* [45].

2.3. Karbapenemazy należące do klasy A wg Amblera

Do β -laktamaz serynowych klasy A, o aktywności karbapenemaz wytwarzanych przez *A. baumannii*, należą enzymy KPC oraz niektóre enzymy z rodziny GES (Guiana extended spectrum). β -laktamazy KPC stanowią zagrożenie przede wszystkim ze względu na obecność genów je kodujących w ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy koniugacyjne, a także ze względu na zakres substratowy, który obejmuje wszystkie antybiotyki β -laktamowe. Dotychczas szczepy z kompleksu *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* wytwarzające enzymy KPC wykryto jedynie w Puerto Rico [93]. Spośród 10 izolatów enzym KPC-3 wytwarzało siedem, natomiast pozostałe 3 szczepy wytwarzały po jednym enzymie: KPC-2, KPC-4 oraz KPC-10 [93].

Coraz częściej izoluje się szczepy *A. baumannii* wytwarzające enzymy z rodziny GES. Wykryto izolaty wytwarzające aktywne wobec karbapenemów enzymy GES-11 i GES-14. Geny *bla*_{GES} zlokalizowane były u szczepów *A. baumannii* w plazmidach w obrębie integronów klasy I [8, 64]. Opisano występowanie szczepów *A. baumannii* wytwarzających GES-11 w Turcji, Belgii, Egipcie, Kuwejcie, Gazie oraz Francji. GES-14 wykryto u szczepów izolowanych w Turcji,

Belgii i Kuwejcie [3]. Oporność na wysokie stężenia karbapenemów może wynikać przede wszystkim z wytwarzania przez dany szczep jednocześnie enzymów z rodziny GES oraz enzymów CHDL. Najczęściej opisywane jest działanie synergistyczne enzymu GES-11 i OXA-23 [17] lub OXA-40 [19].

2.4. Nabyte enzymy ES β L hamowane przez inhibitory β -laktamaz

Enzymy ES β L (extended spectrum β -lactamase) występują u szczepów *A. baumannii* znacznie rzadziej niż oksacylinazy CHDL, a także nie stanowią tak dużego zagrożenia dla zdrowia publicznego ze względu na brak aktywności wobec karbapenemów. Szczepy *A. baumannii* wytwarzające enzymy głównie z rodziny PER (*Pseudomonas* extender resistant), VEB (Vietnam extender spectrum β -lactamase), GES oraz znacznie rzadziej CTX-M (cefotaxime hydrolyzing capabilities), TEM (Temoneira) i SHV (sulfhydryl variable) wykrywane są w wielu częściach świata [86].

Pierwszym enzymem ES β L wykrytym u *A. baumannii* był PER-1 [77]. Enzym ten jest zdolny do hydrolizy penicylin, oksymino-cefalosporyn (III generacja) i aztreonamu. U *A. baumannii* gen *bla*_{PER-1} był częścią transpozonu Tn*1213*. Oflankowany był dwiema różnymi sekwencjami insercyjnymi IS*Pa12* i IS*Pa13*, a ekspresja genu zachodziło przy udziale silnego promotora zlokalizowanego w IS*Pa12* [77]. Enzym PER-1 wytwarzały szczepy *A. baumannii* wyizolowane w Belgii [66], Turcji, Włoszech, Rosji, Korei Południowej, Indiach, Chinach, Japonii [6], Iranie [27]. U szczepów z gatunku *A. baumannii* stwierdzono także obecność enzymów PER-2 [15], PER-3 [4], PER-7 [10] i PER-8 [86]. Gen *bla*_{PER-2}, w odróżnieniu od genu *bla*_{PER-1}, poprzedzała jedna kopia sekwencji IS*Pa12*, lecz nie występowała sekwencja IS*Pa13*. Enzym PER-2 wytwarzały szczepy wyizolowane w Ameryce Południowej [15, 75]. Enzym PER-3 został opisany u gatunku *A. baumannii* w Egipcie [86], PER-7 wykryto we Francji i w Zjednoczonych Emiratach Arabskich [10, 74]. U szczepu wyizolowanego we Francji gen *bla*_{PER-7} zlokalizowano w plazmidzie, w drugim przypadku enzym kodowany był chromosomalnie, jednak w obu przypadkach geny występowały w obrębie integronów klasy I, gdzie poprzedzała je sekwencja IS*CR1* zawierająca sekwencję promotorową. Oporność na wysokie stężenia karbapenemów występowała tylko w przypadku, gdy szczep wytwarzał jednocześnie enzymy PER-7 i OXA-23 [10].

Kolejną grupą enzymów ES β L występujących u *A. baumannii* są enzymy VEB. Szczepy *A. baumannii* wytwarzające enzym VEB-1 były przyczyną zakażeń szpitalnych, które miały miejsce we Francji i trwały 9 miesięcy (od sierpnia 2001 do kwietnia 2002 roku) [80]. Gen kodujący tę β -laktamazę zlokalizowano

w obrębie integronów klasy I w chromosomach bakteryjnych [80]. W Argentynie w 2009 roku wyizolowano cztery szczepy *A. baumannii* wytwarzające enzym VEB-1a. Gen bla_{VEB-1} kodujący tę β -laktamazę był poprzedzony sekwencją ISCR2 [81]. Ponadto, szczepy *A. baumannii* posiadające gen bla_{VEB-1} wykryto w Belgii [66], Iranie, Tajwanie [27, 28] i Ameryce Południowej [75]. Gen bla_{VEB-3} opisano u pojedynczego szczepu *A. baumannii* z Tajwanu, bla_{VEB-7} u szczepu ze Stanów Zjednoczonych [86].

Enzymy z rodziny CTX-M, hydrolizujące cefotaksym i ceftriakson, zostały wykryte u szczepów *A. baumannii* w kilku regionach świata: CTX-M-2 w Japonii [67] i Stanach Zjednoczonych [86], CTX-M-43 w Boliwii i Stanach Zjednoczonych [1, 15], a CTX-M-15 na Haiti [84] i w Indiach [86]. Enzymy z tej grupy są rozpowszechnione wśród pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, natomiast u szczepów *A. baumannii* występują niezmiernie rzadko. Podejrzewa się, że wynika to z obecności genów kodujących tę β -laktamazę w plazmidach o wąskim zakresie gospodarzy, co uniemożliwia ich replikację u pałeczek niefermentujących [84]. U szczepu *A. baumannii* z Haiti gen $bla_{CTX-M-15}$ z poprzedzającą gen sekwencją *ISEcp1*, zlokalizowano w obrębie transpozonu, w bakteryjnym chromosomie [84].

Enzymy typu ES β L należące do rodziny GES, poza tymi o aktywności karbapenemazy, wykrywa się coraz częściej u szczepów *A. baumannii*. β -laktamaza GES-12, wytwarzana przez szczep wyizolowany w Belgii, w wyniku substytucji Thr237Ala (w porównaniu do GES-11) nabrała silnej aktywności hydrolitycznej wobec ceftazydymu [7]. Gen bla_{GES-12} zlokalizowano w obrębie integronu klasy I w plazmidzie [7]. Innym enzymem z tej rodziny wytwarzanym przez *A. baumannii* jest GES-22, który wykryto u dwóch szczepów z Turcji [12]. U obu szczepów gen bla_{GES-22} był zlokalizowany w plazmidzie, w obrębie integronu klasy I.

Nietypowym enzymem ES β L wykrytym u *A. baumannii* jest karbenicylinaza CARB-10, hydrolizująca cefepim i cefpirom, lecz nie wykazująca aktywności wobec ceftazydymu czy cefotaksymu. Szczep posiadający gen $bla_{CARB-10}$ (zlokalizowany w plazmidzie, z poprzedzającą go sekwencją *ISAbal9*) wyizolowano we Francji [85].

2.5. Enzymy AmpC

Szczepy *A. baumannii* posiadają w chromosomie geny kodujące cefalosporynazy typu AmpC. Enzymy tego typu występujące u *A. baumannii* określane są jako enzymy ADC. Geny kodujące te białka ulegają ekspresji na stałym, niskim poziomie, niewystarczającym dla wyrażania oporności na oksymino-cefalosporyny u pałeczek *Acinetobacter*. W przypadku obecności powyżej genu bla_{AmpC} sekwencji insercyjnej *ISAbal1*,

zawierającej silny promotor, ekspresja genu wzrasta. Skutkuje to pojawieniem się oporności na cefalosporyny III generacji: ceftazydym i cefotaksym [95]. Enzymy AmpC, hydrolizujące także cefalosporyny IV generacji, nazywane są enzymami o rozszerzonym zakresie substratowym – ESAC (extended spectrum AmpC). Występują często u gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae* i *P. aeruginosa*, wykryto je również u *A. baumannii*. Aktywność enzymów ESAC jest warunkowana substytucjami, delecjami lub insercjami w sekwencji aminokwasowej w pobliżu centrum aktywnego enzymu. U szczepów *A. baumannii* wykryto należące do tej grupy enzymy ADC-33 i ADC-56. W sekwencji aminokwasowej ADC-33 nastąpiła substytucja Pro210Arg oraz duplikacja Ala w pozycji 215 (wewnątrz pętli omega). Co istotne, obie mutacje muszą mieć miejsce, aby enzym ADC-33 miał szeroki zakres substratowy. Wyizolowany od pacjenta z Gwadelupy szczep *A. baumannii* wytwarzający ADC-33, wykazywał oporność na cefalosporyny III i IV generacji [95]. Drugim enzymem należącym do ESAC i wytwarzanym przez *A. baumannii* jest ADC-56. Poszerzony zakres substratowy tego enzymu wynika z substytucji Arg148Glu. Szczepy, u których wykryto tę cefalosporynazę, pochodziły od dwóch pacjentów z miasta Pittsburgh w Stanach Zjednoczonych. Na podstawie analizy PFGE stwierdzono, że szczepy pochodzące od tych pacjentów były ze sobą spokrewnione i należą do europejskiego klonu 2, kompleks klonalny 92 [105].

W 2014 roku opisano enzym ADC-68, który jest pierwszą β -laktamazą typu AmpC wytwarzaną przez *A. baumannii* posiadającą aktywność karbapenemazy. Szczep pochodził od pacjenta z Korei Południowej i był oporny na penicyliny, cefalotynę, ceftazydym, cefotaksym, imipenem, meropenem i ertapenem. Gen bla_{ADC-68} zlokalizowany był w chromosomie [42].

3. Oporność na antybiotyki inne niż β -laktamy

3.1. Oporność na chinolony i fluorochinolony

Działanie chinolonów i fluorochinolonów polega na hamowaniu replikacji bakteryjnego DNA poprzez oddziaływanie na gyrazę DNA (kodowaną przez geny *gyrA* i *gyrB*) oraz topoizomerazę IV (kodowaną przez geny *parA* i *parC*). Mutacje zachodzące w obrębie genów kodujących te enzymy, powodują brak możliwości przyłączenia się cząsteczki antybiotyku do kompleksu enzym-DNA, ze względu na zmiany strukturalne zachodzące w białku. Do mutacji dochodzi w obszarze warunkującym oporność na chinolony – QRDR (quinolone resistance-determining region). U szczepów *A. baumannii* mutacje odpowiedzialne za wzrost wartości MIC cyprofloksacyny to substy-

tucja Ser83Leu w przypadku GyrA oraz substytucja Ser80Leu w sekwencji ParC [41].

Innym mechanizmem oporności na chinolony są pompy błonowe, zlokalizowane w osłonach komórkowych bakterii, aktywnie usuwające antybiotyki z komórki. Systemy pomp występujące u szczepów *A. baumannii* obejmujące swoim zakresem substratowym tę grupę chemioterapeutyków to: AdeABC, AdeIJK [21], AdeFGH [22] (wszystkie trzy z rodziny RND) a także AbeS (z rodziny SMR) i AbeM (z rodziny MATE) [21]. Oporność szczepów *A. baumannii* na wysokie stężenia chinolonów najczęściej wiąże się ze współobecnością obu przedstawionych powyżej mechanizmów oporności, tj. mutacjami w genach *gyr/par* i działaniem pomp błonowych. Dotychczas nie wykryto u *A. baumannii* genów kodujących pompy błonowe zlokalizowanych w plazmidach warunkujących oporność na chinolony.

3.2. Oporność na aminoglikozydy

Antybiotyki aminoglikozydowe hamują syntezę białek wiążąc się głównie z podjednostką 30S rybosomów. Oporność na te antybiotyki wynika przede wszystkim z wytwarzania enzymów modyfikujących aminoglikozydy, określanych skrótem AME (aminoglycoside-modifying-enzyme). Enzymy AME obejmują O-fosfotransferazy APh (aminoglycoside phosphotransferase), O-adenylotransferazy ANT (aminoglycoside nucleotydylotransferase) i N-acetylotransferazy AAC (aminoglycoside acetyltransferase). Wszystkie trzy wymienione grupy enzymów wykryto również u szczepów *A. baumannii*. Geny kodujące te enzymy często są zlokalizowane w obrębie różnych ruchomych elementów genetycznych, jak: plazmidy, transpozony i integrony. W obrębie integronu, geny kodujące AME występują często z genami warunkującymi oporność na inne grupy antybiotyków np. β -laktamy, co prowadzi do wielolekooporności [8, 64]. Najważniejszymi AME w przypadku opisywanej pałeczki są enzymy: AAC(3')-I modyfikujący gentamycynę, APh(3')-VI modyfikujący amikacynę, kanamycynę i neomycynę oraz AAC(6')-Ib modyfikujący tobramycynę, netilmycynę i amikacynę. W 2014 roku w badaniu przeprowadzonym na 173 szczepach *A. baumannii*, odsetek szczepów opornych na aminoglikozydy, gdzie wartości MIC amikacyny i gentamycyny są wyższe niż 512 μ g/ml, osiągnął 59% [69]. Wśród wszystkich badanych szczepów wykryto 15 różnych enzymów AME [69]. Najczęściej występowały enzymy ANT(3'')-I (115 szczepów), AAC(3')-I (78 szczepów), APh(3')-I (59 szczepów) oraz AAC(6')-Ib (56 szczepów).

Innym mechanizmem oporności na aminoglikozydy jest metylacja miejsca aktywnego w rybosomie przez metylazy. U *A. baumannii* wykryto metylazy ArmA i RmtB. Wytwarzanie enzymu ArmA opisano

u szczepów *A. baumannii* izolowanych z wielu krajów: Chin, Korei Południowej, Wietnamu, Japonii, Stanów Zjednoczonych, Norwegii, Włoch, Bułgarii, Iranu i Algierii [86]. Doi i wsp. [26] wykryli u 5 badanych szczepów *A. baumannii* obecność genu *armA*. U jednego izolatu gen ten był zlokalizowany w obrębie transpozonu Tn1548, obecnego w plazmidzie. W innym badaniu gen *armA* został wykryty u 59,5% badanych szczepów *A. baumannii* i u 98% szczepów tego gatunku opornych na aminoglikozydy [69]. Metylazę RmtB wykryto u 9 szczepów *A. baumannii* wyizolowanych w Wietnamie [86].

Wpływ na oporność szczepów *A. baumannii* na aminoglikozydy ma również nadekspresja systemów pomp błonowych AdeABC i AdeFGH, z rodziny RND [21]. Antybiotyki aminoglikozydowe: kanamycyna i gentamycyna, są także substratami dla pompy AbeM z rodziny MATE, która występuje u szczepów *A. baumannii* [103].

3.3. Oporność na kolistynę

Kolistyna, inaczej polimyksyna E, należy do grupy polikationowych, antybiotyków peptydowych. Jej aktywność bakteriobójcza wiąże się z działaniem na lipid A powodując dezorganizację błony zewnętrznej bakterii. Istnieją dwie hipotezy dotyczące mechanizmu oporności *A. baumannii* na kolistynę. Pierwsza z nich sugeruje całkowitą utratę przez bakterię LPS. W wyniku mutacji w genach *lpxA*, *lpxC* lub *lpxD*, bądź obecności sekwencji insercyjnej IS*Aba11* inaktywującej te geny, dochodzi do przedwczesnej terminacji translacji białka katalizującego biosyntezę lipidu A i w konsekwencji do całkowitej utraty LPS [72]. Oznacza to brak punktu uchwytu dla kolistyny i oporność szczepu na ten związek.

Druga teoria dotyczy modyfikacji LPS. Mutacje w genach *pmrA* i/lub *pmrB*, kodujących system dwuskładnikowy PmrA/PmrB prowadzą do konstytutywnej ekspresji genu *pmrA*, który z kolei bierze udział w up-regulacji operonu *pmrCAB*. Reguluje on syntezę i transfer fosfoetanolaminy do lipidu A. Doprowadza to do obniżenia ładunku ujemnego lipidu A, co jednocześnie zmniejsza powinowactwo kolistyny do LPS. Niektóre szczepy *A. baumannii* posiadają gen *pmrC*-like, nazwany *eptA*, którego ekspresja jest wyższa u szczepów opornych na kolistynę [72].

Po raz pierwszy szczepy z rodzaju *Acinetobacter* odporne na kolistynę wyizolowano w Czechach w 1999 roku. W kolejnych latach stwierdzono ich obecność w Hiszpanii i Bułgarii, a także poza Europą – w Australii, Azji, Ameryce Północnej i Południowej. Najwyższy odsetek (40,6%) szczepów opornych na kolistynę notowano w Hiszpanii.

Kolistyna należy do antybiotyków ostatniej szansy w przypadku zakażeń wielolekoopornymi szczepami

A. baumannii. W lecznictwie stosuje się mieszaninę siarczanów polimyksyny B i E. W latach 70. XX wieku zaprzestano podawania kolistyny chorym ze względu na silne działania niepożądane (nefro- i neurotoksyczność). Jednak najnowsze badania wskazują, iż toksyczność kolistyny okazała się niższa niż pierwotnie sądzono [58]. Nie ulega jednak wątpliwości, że monoterapia zwiększa prawdopodobieństwo wytworzenia oporności na podawany antybiotyk, natomiast leczenie skojarzone może prowadzić do kumulacji działań niepożądanych. Ponadto, monoterapia może przyczynić się do wykształcenia się heterooporności szczepów [58]. Liu i wsp. [58] przeprowadzili w 2014 roku analizę skuteczności i bezpieczeństwa stosowania mono- i politerapii polimyksynami. Uzyskane wyniki wskazywały na skuteczność kliniczną polimyksyn. Analiza wykazała również podobną nefrotoksyczność podawanej kolistyny i placebo. Mimo stosowania polimyksyn w połączeniu z innymi, potencjalnie uszkadzającymi nerki antybiotykami (np. aminoglikozydami), uszkodzenie nerek ujawniło się u zaledwie 11% pacjentów, a w przypadku dwóch innych badań, niewydolności nerek w ogóle nie stwierdzono [58].

4. Aktywne usuwanie antybiotyków z komórki bakteryjnej przy udziale pomp błonowych – mechanizm efflux

Oporność szczepów *A. baumannii* na antybiotyki warunkują także mechanizmy nieenzymatyczne, takie jak: aktywność pomp błonowych usuwających antybiotyk z komórki bakteryjnej oraz modyfikacje/utrata

kanałów umożliwiających dotarcie substancji przeciwdrobnoustrojowej do wnętrza bakterii. Dotychczas poznano 5 systemów pomp MDR biorących udział w czynnym usuwaniu antybiotyków z komórki bakteryjnej. Pompy sklasyfikowano w rodziny lub superrodziny. U szczepów *A. baumannii* opisano występowanie systemów pomp: SMR (small multidrug resistance), MATE (multidrug and toxic compound extrusion), MFS (major facilitator superfamily), RND (resistance nodulation cell division) [21] oraz PACE (proteobacterial antimicrobial compound efflux) [35]. Poza systemami pomp, których geny występują w chromosomie szczepów *A. baumannii* (do których zaliczają się pompy z rodziny RND, MATE, SMR, pompa AmvA i CraA z rodziny MFS) poznano również nabyte systemy efflux, o wąskim zakresie substratowym, które warunkują oporność szczepów na tetracykliny i chloramfenikol, czyli należące do rodziny MFS pompy TetA, TetB, CmlA i CmlA5. W tabeli II zestawiono informacje o pompach błonowych opisanych dotychczas u szczepów *A. baumannii*.

4.1. Systemy pomp RND

Systemy pomp z rodziny RND są najbardziej rozpowszechnionymi wśród bakterii Gram-ujemnych pompami MDR. Mają największe znaczenie kliniczne i są zdolne usunąć z komórki wiele substancji o różnej budowie: antybiotyki, bromek etydyny, SDS (dodecylo siarczan sodu), triklosan oraz rozpuszczalniki organiczne. Systemy pomp z rodziny RND złożone są z trzech grup białek: białek RND, czyli transporterów w błonie cytoplazmatycznej, białek OMF (outer

Tabela II
Pompy błonowe obecne w osłonach komórkowych *A. baumannii*

Rodzina pomp	Pompa MDR	Zakres substratowy	Piśmienictwo
RND	System AdeABC	β-laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, fluorochinolony, tetracykliny, tygecyklina, chloramfenikol, trimetoprim	[21]
	System AdeIJK	cefalosporyny, tykarcylina, aztreonam, fluorochinolony, linkozamidy, tetracykliny, tygecyklina, ryfampicyna, chloramfenikol, kwas fusydowy, nowobiocyna	[96]
	System AdeFGH	fluorochinolony, klindamycyna, tetracykliny, tygecyklina, chloramfenikol, trimetoprim, sulfametoksazol	[22]
MFS	CraA	chloramfenikol	[94]
	AmvA	erytromycyna, bromek etydyny, parakwat	[88]
	TetA	tetracyklina	[91]
	TetB	tetracyklina, doksycyklina, minocyklina	
	CmlA, CmlA5	chloramfenikol	[57]
MATE	AbeM	gentamycyna, kanamycyna, fluorochinolony, chloramfenikol, trimetoprim, bromek etydyny, DAPI, triklosan, tryptoflawina, doksorubicyna, rodamina 6G, TPPCI	[103]
SMR	AbeS	erytromycyna, fluorochinolony, chloramfenikol, nowobiocyna, SDS, bromek etydyny, deoksycholan	[102]
PACE	AceI	chlorheksydyna, chlorek benzalkoniowy, chlorek dekwaliniowy, aryflawina, proflawina	[35]

membrane factor) pełniących funkcję kanałów w błonie zewnętrznej oraz białek MFP (major fusion protein), które tworzą kanały łączące transportery RND z białkami OMF. Dzięki tej budowie, systemy pomp umożliwiają transport substancji poprzez obie błony (wewnętrzną i zewnętrzną). Geny kodujące białka pomp tworzą operony, w skład których wchodzi kolejno: promotor, gen kodujący białka MFP, gen kodujący białka transportera RND w błonie oraz gen kodujący białka OMF. Jedynie nadekspresja operonu nadaje szczepowi fenotyp wielolekooporności [51].

Pierwszym opisanym u pałeczek *A. baumannii* systemem z rodziny pomp RND był AdeABC (*Acinetobacter* drug efflux). Następnie odkryto u tego gatunku pałeczek kolejne dwa systemy pomp AdeFGH i AdeIJK [21]. Geny *adeA*, *adeB* i *adeC* tworzą operon *adeABC*, którego ekspresja jest ściśle regulowana przez dwuskładnikowy system regulatorowy AdeR-AdeS [61]. Zmiany w białkach *adeR* (substytucja Pro116Leu) i *adeS* (substytucja Thr153Met), a także obecność sekwencji *ISAbal* przed operonem *adeABC*, powoduje jego nadekspresję. System pomp AdeABC warunkuje oporność (przy nadekspresji) na szereg grup antybiotyków (tabela II) [21]. Udział systemu AdeABC w oporności na karbapenemy jest niejasny. Badania aktywności karbapenemów w obecności i bez użycia inhibitorów pomp nie wykazały różnic. Oporność na wysokie stężenia tych antybiotyków stwierdza się, gdy nadekspresja genów kodujących ten system pomp występuje jednocześnie z wytwarzaniem enzymów CHDL [36].

Innym systemem pomp z rodziny RND u szczepów *A. baumannii* jest system AdeIJK kodowany przez operon *adeIJK*. Warunkuje oporność na część antybiotyków usuwanych przez system AdeABC, a także na β -laktamy takie jak cefalosporyny, tykarcylina, i aztreonam oraz linkozamidy, ryfampicynę, kwas fusydowy, nowobiocynę (tabela II). Gen regulujący ekspresję operonu *adeIJK* określono w 2012 roku [96]. Był to gen *adeN*, kodujący białko *adeN* z rodziny białek TetR. Gen ten funkcjonował jako represor.

Kolejnym systemem pomp z rodziny RND opisanym u szczepów *A. baumannii* jest system AdeFGH. Geny kodujące ten system tworzą operon *adeFGH*. Otwarta ramka odczytu kodująca regulator transkrypcji typu LysR – gen *adeL*, zlokalizowana jest powyżej operonu *adeFHG*, a jej transkrypcja zachodzi w przeciwnym kierunku. Mutacje w obrębie genu *adeL* warunkują nadekspresję systemu pomp AdeFGH [22]. Podobnie, jak u pomp wymienionych wyżej, nadekspresja genów tworzących operon nadaje bakterii fenotyp wielolekooporności. Pompa nadaje szczepom oporność na fluorochinolony, klindamycynę, chloramfenikol, trimetoprim, a obniżoną wrażliwość na tetracykliny, tygecyklinę, sulfametoksazol.

4.2. Inne systemy pomp błonowych

Poza systemami pomp z rodziny RND u *A. baumannii* wykryto także inne pompy, przyczyniające się do wzrostu oporności na określone antybiotyki (tabela II).

System odpowiedzialny za naturalną oporność na chloramfenikol, to pompa CraA (chloramphenicol resistance *Acinetobacter*) [94], należąca do rodziny MFS. Z rodziny pomp MFS, wykryto także pompę AmvA, odpowiedzialną głównie za usuwanie erytromycyny, bromku etydyny i parakwatu [88]. Kolejny system, AbeM, należący do rodziny MATE, odpowiada za co najmniej 4-krotny wzrost wartości MIC gentamycyny, fluorochinolonów, 4,6-diamino-2-fenylindolu (DAPI), triklosanu, tryptoflawiny, doksorubicyny, rodaminy 6G i bromku etydyny oraz za 2-krotny wzrost MIC kanamycyny, chloramfenikolu, trimetoprimu i chlorku tetrafenylofosforowego (TPPCL) [103]. Należy zaznaczyć, iż badania dotyczące oporności warunkowanej obecnością pompy AbeM przeprowadzono na komórkach *Escherichia coli*. Pompa AbeS z rodziny SMR, kodowana przez znajdujący się w chromosomie gen *abeS*, warunkuje oporność niskiego stopnia (3–8-krotny spadek wartości MIC przy inaktywacji pompy) na erytromycynę, fluorochinolony, chloramfenikol, nowobiocynę, a także na SDS, bromek etydyny, deoksycholan [102].

Zdolność nabywania nowych genów oporności przez szczepy *A. baumannii* dotyczy także genów kodujących pompy MDR. Poza opisanymi wyżej genami znajdującymi się w chromosomie odkryto geny stanowiące części plazmidów czy transpozonów, nabytych przez bakterie. Do tej grupy należą pompy z rodziny MFS: TetA, TetB i CmlA, CmlA5. Najczęściej występującymi pompami u szczepów *A. baumannii* są TetA i TetB, które odpowiadają za usuwanie tetracykliny. Pompa TetB usuwa również minocyklinę i doksycyklinę. Geny *tetR* i *tetA* zlokalizowano w obrębie transpozonu Tn1721-like, natomiast gen *tetB* w plazmidach [91]. Oporność na chloramfenikol była warunkowana przez pompy CmlA i CmlA5 [57].

W 2013 roku Hassan i wsp. [35], opisali nową rodzinę pomp MDR – rodzinę PACE. Gen *aceI*, kodujący pompę AceI (*Acinetobacter* chlorhexidine efflux protein I), należąca do tej rodziny, zlokalizowany jest w chromosomie bakteryjnym. Badania wykazały, że nadekspresja genu zachodzi, gdy w środowisku bakterii znajdzie się chlorheksydyna w stężeniu poniżej wartości nadającej jej aktywność. Obecność białka AceI potwierdzono u *A. baumannii*, natomiast białka homologiczne do AceI znaleziono u *P. aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Burkholderia cenocepacia*, *Veillonella parvula* oraz *E. coli*. Substratem dla tej pompy u wszystkich przebadanych gatunków jest chlorheksydyna (stanowiąca składnik antybakteryjnych mydeł i płynów do

plukania ust). Niektóre białka AceI warunkują oporność także na inne substancje o działaniu dezynfekcyjnym i antyseptycznym (tabela II).

5. Kanały błonowe – pory

U bakterii Gram-ujemnych w skład osłon komórkowych, chroniących m.in. przed szkodliwymi czynnikami z zewnątrz, wchodzi błona zewnętrzna. Poza systemami pomp aktywnie usuwającymi szkodliwe substancje z komórki, istotnym pod względem oporności elementem błony, są kanały (pory) białkowe. Umożliwiają one transport cząsteczek poprzez podwójną warstwę lipidową budującą błonę zewnętrzną. Zmiany w strukturze lub zmiany w regulacji ekspresji genów kodujących te kanały mogą być dla bakterii mechanizmem obronnym przed działaniem środków przeciwdrobnoustrojowych. Szczepy *A. baumannii* posiadają względnie niską liczbę porów, i dodatkowo o niewielkich rozmiarach, co ogranicza naturalną przepuszczalność błony zewnętrznej i tym samym nadaje większą oporność na substancje przeciwbakteryjne. Odkryto trzy rodzaje kanałów błonowych, w przypadku których spadek ekspresji genów je kodujących ma znaczenie w oporności na antybiotyki u *A. baumannii*: CarO, Omp 33–36 oraz OprD.

Występujący u szczepów *A. baumannii* kanał białkowy CarO (carbapenem associated outer membrane protein) odpowiedzialny jest za transport do wnętrza komórki ornityny i innych aminokwasów, a także, ze względu na konformację strukturalną i miejsce wiązania, jest zdolny do transportu imipenemu (ale nie meropenemu) [13]. Warto podkreślić, iż jest to jedyne białko OMP u szczepów *A. baumannii*, które posiada miejsce wiązania dla imipenemu, co czyni je selektywnym kanałem pod względem wychwytu antybiotyków. Ze względu na różnice w budowie kanału wyróżnia się jego dwa rodzaje: CarOa i CarOb. Kanał CarOb wykazuje większe powinowactwo do imipenemu niż CarOa [13]. Mechanizm oporności na imipenem, w którym bierze udział białko CarO może dotyczyć (i) inaktywacji genu *carO*, co powoduje brak porów w błonie; (ii) zmiany w sekwencji aminokwasowej CarOa lub CarOb co może prowadzić do niskiego bądź znikomego powinowactwa do konkretnego antybiotyku; i/lub (iii) obniżenia ekspresji genów i niskiej liczby porów w błonie [30].

Kanał OprD-homolog, wykazujący 46–57% podobieństwa do specyficznego dla karbapenemów białka OprD, występującego u *P. aeruginosa*, wydawał się mieć duży wpływ na oporność na te antybiotyki również u pałeczek *A. baumannii*. Dokładniejsze badania nie wykazały jednak tej zależności [14, 101]. U szczepów *A. baumannii* białko OprD bierze udział w wychwycie jonów Fe^{3+} i Mg^{2+} [14].

Oporność szczepów *A. baumannii* na imipenem i meropenem może wynikać także ze zmniejszonej ekspresji kanałów błonowych Omp 33–36 [24].

Warto wspomnieć o białku OprA, które chociaż nie warunkuje oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki u szczepów *A. baumannii*, to jest czynnikiem zjadliwości tych bakterii poprzez pośredniczenie w adhezji i inwazji komórek nabłonkowych, w powstawaniu biofilmu oraz w indukcji apoptozy komórki [62].

6. Biofilm i zjawisko quorum sensing

Zdolność do tworzenia biofilmu jest istotnym czynnikiem wirulencji u pałeczek *A. baumannii*. Powszechnie wiadomo, że bakterie rosnące w formie biofilmu mają obniżoną wrażliwość na leki przeciwbakteryjne, środki dezynfekcyjne, a także trudno poddają się działaniu mechanizmów odpornościowych gospodarza. Biofilm bakteryjny może występować na powierzchniach wyrobów medycznych, jak cewniki urologiczne i sprzęt do intubacji. Wykazano, iż adhezja komórek *A. baumannii* do nabłonka jest pierwszym etapem w kolonizacji gospodarza, po której może dojść do rozwoju zakażenia [59].

Za wirulencję szczepów *A. baumannii* rosnących w postaci biofilmu odpowiedzialne są geny systemu CsuA/BABCDE (regulowane przez dwuskładnikowy system BfmS/BfmR). Produktem tych genów są: białka tworzące fimbrie, umożliwiające przyleganie komórek bakteryjnych do powierzchni, białko OmpA (38 kDa), białko błony zewnętrznej o wielkości 854 kDa (wykazujące duże podobieństwo do białka Bap – biofilm associated protein, występującego w rodzaju *Staphylococcus*), syntaza AbaI, będąca częścią systemu quorum sensing (QS) oraz locus *pgaABCD* kodujący białko biorące udział w syntezie poli- β -(1,6)-N-acetylo-glukozaminy (PNAG) [59]. Przeprowadzone badania wykazały, że mutacje w obrębie genów *bap* hamują wzrost biofilmu i powodują spadek zdolności przylegania *A. baumannii* do komórek nabłonka [34]. Na powstawanie biofilmu ma wpływ stężenie żelaza zewnątrzkomórkowego (im niższe stężenie, tym mniejsza zdolność adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni). Ponadto, została postawiona hipoteza, że obecność genów oporności na antybiotyki, np. genu *bla*_{PER-1} ma silny związek z powstawaniem biofilmu u opisywanych pałeczek. Badania Lee i wsp. [52], wskazywały na silny związek obecności genu *bla*_{PER-1} i tworzenia biofilmu, jednak inne badania przeczyły tym wynikom [89]. Kwestia ta nie została dotychczas rozstrzygnięta, jednak uważa się, iż opisywana korelacja dotyczy bardziej zdolności komórek do adhezji niż do formowania dojrzałego biofilmu [89]. Wpływ na powstawanie biofilmu innego rodzaju czynników, jak np. stan pacjenta, miejsce izo-

lacji szczepu klinicznego czy typ molekularny szczepu, wymaga prowadzenia dalszych badań.

Zjawisko *quorum sensing* (QS) jest mechanizmem komunikacji między komórkami bakteryjnymi, która polega na wytwarzaniu, odbieraniu i odpowiedzi bakterii na cząsteczki zwane autoinduktorami (AI). U szczepów *A. baumannii* rolę AI pełnią N-acylowane laktony homoseryny (AHL), syntetyzowane przez syntazę AHL (homolog LuxI). Laktony AHL wiążą się ze swoim receptorem (LuxR homolog), powstaje kompleks AHL-LuxR, który kontroluje ekspresję genów zależnych od systemu QS.

7. Podsumowanie

Zdolność szczepów *A. baumannii* do nabywania nowych determinantów oporności uczyniła z opisywanej pałeczki jeden z najbardziej niebezpiecznych patogenów szpitalnych ostatnich dwóch dekad. Szczepy *A. baumannii* posiadające geny oporności na karbapenemy, zlokalizowane w plazmidach, stanowią groźny rezerwuuar mechanizmów oporności mogący zostać przekazany innym bakteriom. Rosnąca liczba izolowanych szczepów z gatunku *A. baumannii* opornych na karbapenemy ogranicza dostępne opcje terapeutyczne. Poza karbapenemazami występującymi również u pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* i *P. aeruginosa* (takimi jak NDM, KPC czy MBL), u szczepów *A. baumannii* występują swoiste enzymy CHDL. Dodatkowo, nadekspresja genów kodujących pompy MDR i zmniejszona przepuszczalność błony zewnętrznej, występujące jednocześnie z karbapenemazami mogą uczynić ze szczepów z gatunku *A. baumannii* bakterię wielolekooporną. W związku z tym niezbędne jest prowadzenie badań nad rozprzestrzenianiem się genów kodujących karbapenemazy, poszukiwaniem nowych enzymów oddziałujących na antybiotyki i analiza ich zakresu substratowego, tak aby zminimalizować ryzyko nieskutecznej terapii zakażeń wywołanych pałeczkami *A. baumannii*.

Piśmiennictwo

- Adams-Haduch J.M., Paterson D.L., Sidjabat H.E., Pasculle A.W., Potoski B.A., Muto C.A., Harrison L.H., Doi Y.: Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **52**, 3837–3843 (2008)
- Afzal-Shah M., Woodford N., Livermore D.M.: Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**, 583–588 (2001)
- Al-Agamy M.H., Khalaf N.G., Tawfick M.M., Shibl A.M., El Kholy A.: Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. *Int. J. Infect. Dis.* **22**, 49–54 (2014)
- Al-Hassan L., El Mahallawy H., Amyes S.G.: First report of *bla*-(PER-3) in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **41**, 93–94 (2013)
- Ambler R.: The structure of β -lactamases. *Philos. T. R. Soc. B.* **289**, 321–331 (1980)
- Bae I.K., Jang S.J., Kim J., Jeong S.H., Cho B., Lee K.: Interspecies dissemination of the *bla* gene encoding PER-1 extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **55**, 1305–1307 (2011)
- Bogaerts P., Naas T., El Garch F., Cuzon G., Deplano A., Delaire T., Huang T.D., Lissor B., Nordmann P., Glupczynski Y.: GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **54**, 4872–4878 (2010)
- Bonnin R.A., Nordmann P., Potron A., Lecuyer H., Zahar J.R., Poirel L.: Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **55**, 349–354 (2011)
- Bonnin R.A., Poirel L., Naas T., Pirs M., Seme K., Schrenzel J., Nordmann P.: Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, E362–365 (2012)
- Bonnin R.A., Potron A., Poirel L., Lecuyer H., Neri R., Nordmann P.: PER-7, an extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward broad-spectrum cephalosporins in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **55**, 2424–2427 (2011)
- Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J.: Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1–12 (2009)
- Castanheira M., Costello S.E., Woosley L.N., Deshpande L.M., Davies T.A., Jones R.N.: Evaluation of clonality and carbapenem resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex and *Enterobacteriaceae* isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel β -lactamases, GES-22 and VIM-35. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **58**, 7358–7366 (2014)
- Catel-Ferreira M., Coadou G., Molle V., Mugnier P., Nordmann P., Siroy A., Jouenne T., De E.: Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2053–2056 (2011)
- Catel-Ferreira M., Nehme R., Molle V., Aranda J., Bouffartigues E., Chevalier S., Bou G., Jouenne T., De E.: Deciphering the function of the outer membrane protein OprD homologue of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **56**, 3826–3832 (2012)
- Celenza G., Pellegrini C., Caccamo M., Segatore B., Amicosante G., Perilli M.: Spread of *bla*(CTX-M-type) and *bla*(PER-2) β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 975–978 (2006)
- Chagas T.P., Carvalho K.R., de Oliveira Santos I.C., Carvalho-Assef A.P., Asensi M.D.: Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): country-wide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **79**, 468–472 (2014)
- Charfi-Kessiss K., Mansour W., Ben Haj Khalifa A., Mastouri M., Nordmann P., Aouni M., Poirel L.: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the *bla*(OXA-23) and the *bla*(GES-11) genes in a neonatology center in Tunisia. *Microb. Pathog.* **74**, 20–24 (2014)
- Chu Y.W., Afzal-Shah M., Houang E.T., Palepu M.I., Lyon D.J., Woodford N., Livermore D.M.: IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong

- Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**, 710–714 (2001)
19. Cicek A.C., Saral A., Iraz M., Ceylan A., Duzgun A.O., Peleg A.Y., Sandalli C.: OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 410–415 (2014)
 20. Clock S.A., Tabibi S., Alba L., Kubin C.J., Whittier S., Saiman L.: *In vitro* activity of doripenem alone and in multi-agent combinations against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **76**, 343–346 (2013)
 21. Coyne S., Courvalin P., Perichon B.: Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 947–953 (2011)
 22. Coyne S., Rosenfeld N., Lambert T., Courvalin P., Perichon B.: Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4389–4393 (2010)
 23. Da Silva G.J., Correia M., Vital C., Ribeiro G., Sousa J.C., Leitao R., Peixe L., Duarte A.: Molecular characterization of *bla*(IMP-5), a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 33–39 (2002)
 24. del Mar Tomas M., Beceiro A., Perez A., Velasco D., Moure R., Villanueva R., Martinez-Beltran J., Bou G.: Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 5172–5175 (2005)
 25. Djahmi N., Donyach-Remy C., Pantel A., Dekhil M., Sotto A., Lavigne J.P.: Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 305784 (2014)
 26. Doi Y., Adams J.M., Yamane K., Paterson D.L.: Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 4209–4210 (2007)
 27. Fallah F., Noori M., Hashemi A., Goudarzi H., Karimi A., Erfanimanesh S., Alimehr S.: Prevalence of *bla*(NDM), *bla*(PER), *bla*(VEB), *bla*(IMP), and *bla*(VIM) genes among *Acinetobacter baumannii* isolated from two hospitals of Tehran, Iran. *Scientifica (Cairo)*. **2014**, 245162 (2014)
 28. Farajnia S., Azhari F., Alikhani M.Y., Hosseini M.K., Peymani A., Sohrabi N.: Prevalence of PER and VEB type extended spectrum β -lactamases among multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in north-west of Iran. *Iran. J. Basic. Med. Sci.* **16**, 751–755 (2013)
 29. Figueiredo S., Poirel L., Papa A., Koulourida V., Nordmann P.: First identification of VIM-4 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 289–290 (2008)
 30. Fonseca E.L., Scheidegger E., Freitas F.S., Cipriano R., Vicente A.C.: Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of *carO* alleles expression and *bla*(OXA-23) gene. *BMC Microbiol.* **13**, 245 (2013)
 31. Fu Y., Jiang J., Zhou H., Jiang Y., Fu Y., Yu Y., Zhou J.: Characterization of a novel plasmid type and various genetic contexts of *bla*(OXA-58) in *Acinetobacter* spp. from multiple cities in China. *PLoS One*. **9**, e84680 (2014)
 32. Gales A.C., Tognim M.C., Reis A.O., Jones R.N., Sader H.S.: Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**, 77–79 (2003)
 33. Garriety G.M.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2: Proteobacteria. Springer, Nowy York, 2005
 34. Goh H.M., Beatson S.A., Totsika M., Moriel D.G., Phan M.D., Szubert J., Runnegar N., Sidjabat H.E., Paterson D.L., Nimmo G.R., Lipman J., Schembri M.A.: Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 6535–6543 (2013)
 35. Hassan K.A., Liu Q., Henderson P.J., Paulsen I.T.: Homologs of the *Acinetobacter baumannii* Acel transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *MBio*, **6**, (2015)
 36. Heritier C., Poirel L., Lambert T., Nordmann P.: Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3198–3202 (2005)
 37. Higgins P.G., Perez-Llarena F.J., Zander E., Fernandez A., Bou G., Seifert H.: OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2121–2126 (2013)
 38. Higgins P.G., Poirel L., Lehmann M., Nordmann P., Seifert H.: OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **53**, 5035–5038 (2009)
 39. Higgins P.G., Schneiders T., Hamprecht A., Seifert H.: *In vivo* selection of a missense mutation in *adeR* and conversion of the novel *bla*(OXA-164) gene into *bla*(OXA-58) in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospitalized patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5021–5027 (2010)
 40. Hujer K.M., Bonomo R.A. i wsp.: Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 β -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **49**, 2941–2948 (2005)
 41. Hujer K.M., Bonomo R.A. i wsp.: Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1436–1442 (2009)
 42. Jeon J.H., Lee S.H. i wsp.: Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum β -lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **70**, 2924–2936 (2014)
 43. Kaase M., Nordmann P., Wichelhaus T.A., Gatermann S.G., Bonnin R.A., Poirel L.: NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1260–1262 (2011)
 44. Karthikeyan K., Thirunarayan M.A., Krishnan P.: Coexistence of *bla*(OXA-23) with *bla*(NDM-1) and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2253–2254 (2010)
 45. Kayama S., Shigemoto N., Shimizu W., Kuwahara R., Ikeda M., Ikebe K., Maeda K., Hisatsune J., Ohge H., Sugai M.: Tripoli metallo- β -lactamase-1 (TMB-1)-producing *Acinetobacter* spp. with decreased resistance to imipenem in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2477–2478 (2014)
 46. Kempf M., Rolain J.M.: Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **39**, 105–114 (2012)
 47. Kim C.K., Lee Y., Lee H., Woo G.J., Song W., Kim M.N., Lee W.G., Jeong S.H., Lee K., Chong Y.: Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **68**, 432–438 (2010)
 48. Koh T.H., Sng L.H., Wang G.C., Hsu L.Y., Zhao Y.: IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 627–632 (2007)
 49. Kulkova N., Babalova M., Sokolova J., Krcmery V.: First report of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing strains in Slovakia. *Microb. Drug Resist.*, (2014)
 50. Kuo S.C., Yang S.P., Lee Y.T., Chuang H.C., Chen C.P., Chang C.L., Chen T.L., Lu P.L., Hsueh P.R., Fung C.P.: Disse-

- mination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with new plasmid-borne *bla*(OXA-72) in Taiwan. *BMC Infect. Dis.* **13**, 319 (2013)
51. Laudy A.E.: Systemy MDR – istotny mechanizm oporności pałczek Gram-ujemnych na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Post. Mikrobiol.* **47**, 415–422 (2008)
 52. Lee H.W., Koh Y.M., Kim J., Lee J.C., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T., Kim J.: Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect.* **14**, 49–54 (2008)
 53. Lee K., Lee W.G., Uh Y., Ha G.Y., Cho J., Chong Y.: VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 868–871 (2003)
 54. Lee K., Yum J.H., Yong D., Lee H.M., Kim H.D., Docquier J.D., Rossolini G.M., Chong Y.: Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4485–4491 (2005)
 55. Lee Y., Chong Y. i wsp.: Increasing prevalence of *bla*OXA-23-carrying *Acinetobacter baumannii* and the emergence of *bla*OXA-182-carrying *Acinetobacter nosocomialis* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **77**, 160–163 (2013)
 56. Lin M.F., Lan C.Y.: Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J. Clin. Cases.* **2**, 787–814 (2014)
 57. Liu F., Zhu Y., Yi Y., Lu N., Zhu B., Hu Y.: Comparative genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants. *BMC Genomics*, **15**, 1163 (2014)
 58. Liu Q., Li W., Feng Y., Tao C.: Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, **9**, e98091 (2014)
 59. Longo F., Vuotto C., Donelli G.: Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* **37**, 119–127 (2014)
 60. Mammina C., Giammanco A. i wsp.: Characterization of *Acinetobacter baumannii* from intensive care units and home care patients in Palermo, Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, E12–15 (2011)
 61. Marchand I., Damier-Piolle L., Courvalin P., Lambert T.: Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3298–3304 (2004)
 62. Mortensen B.L., Skaar E.P.: The contribution of nutrient metal acquisition and metabolism to *Acinetobacter baumannii* survival within the host. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 95 (2013)
 63. Mosqueda N., Tomas M. i wsp.: Characterization of plasmids carrying the *bla*(OXA-24/40) carbapenemase gene and the genes encoding the AbkA/AbkB proteins of a toxin/antitoxin system. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 2629–2633 (2014)
 64. Moubareck C., Bremont S., Conroy M.C., Courvalin P., Lambert T.: GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3579–3581 (2009)
 65. Mugnier P.D., Poirel L., Naas T., Nordmann P.: Worldwide dissemination of the *bla*(OXA-23) carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 35–40 (2010)
 66. Naas T., Bogaerts P., Bauraing C., Degheltre Y., Glupczynski Y., Nordmann P.: Emergence of PER and VEB extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 178–182 (2006)
 67. Nagano N., Nagano Y., Cordevant C., Shibata N., Arakawa Y.: Nosocomial transmission of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3978–3984 (2004)
 68. Nakazawa Y., Tateda K. i wsp.: A case of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* transferred from India to Japan. *J. Infect. Chemother.* **19**, 330–332 (2013)
 69. Nie L., Lv Y., Yuan M., Hu X., Nie T., Yang X., Li G., Pang J., Zhang J., Li C.: Genetic basis of high level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* from Beijing, China. *Acta Pharm. Sinic.* **4**, 295–300 (2014)
 70. Nowak P., Paluchowska P., Budak A.: Distribution of *bla*(OXA) genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiol.* **35**, 317–325 (2012)
 71. O'Shea M.K.: *Acinetobacter* in modern warfare. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **39**, 363–375 (2012)
 72. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M.: Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* **5**, 1–18 (2014)
 73. Opazo A., Dominguez M., Bello H., Amyes S.G., Gonzalez-Rocha G.: OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J. Infect. Dev. Ctries.* **6**, 311–316 (2012)
 74. Opazo A., Sonnevend A., Lopes B., Hamouda A., Ghazawi A., Pal T., Amyes S.G.: Plasmid-encoded PER-7 β -lactamase responsible for ceftazidime resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated in the United Arab Emirates. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1619–1622 (2012)
 75. Pasteran F., Rapoport M., Petroni A., Faccone D., Corso A., Galas M., Vazquez M., Procopio A., Tokumoto M., Cagnoni V.: Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **50**, 3222–3224 (2006)
 76. Pillonetto M., Arend L., Vespero E.C., Pelisson M., Chagas T.P., Carvalho-Assef A.P., Asensi M.D.: First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 7592–7594 (2014)
 77. Poirel L., Cabanne L., Vahaboglu H., Nordmann P.: Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase *bla*(PER-1) gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1708–1713 (2005)
 78. Poirel L., Mansour W., Bouallegue O., Nordmann P.: Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1613–1617 (2008)
 79. Poirel L., Marque S., Heritier C., Segonds C., Chabanon G., Nordmann P.: OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 202–208 (2005)
 80. Poirel L., Menuteau O., Agoli N., Cattoen C., Nordmann P.: Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3542–3547 (2003)
 81. Poirel L., Mugnier P.D., Toleman M.A., Walsh T.R., Rapoport M.J., Petroni A., Nordmann P.: ISCR2, another vehicle for *bla* (VEB) gene acquisition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4940–4943 (2009)
 82. Poirel L., Naas T., Nordmann P.: Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 24–38 (2010)
 83. Poirel L., Nordmann P.: Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1442–1448 (2006)
 84. Potron A., Munoz-Price L.S., Nordmann P., Cleary T., Poirel L.: Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5946–5948 (2011)

85. Potron A., Poirel L., Croize J., Chanteperdrix V., Nordmann P.: Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type β -lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3010–3016 (2009)
86. Potron A., Poirel L., Nordmann P.: Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **45**, 568–585 (2015)
87. Rafei R., Dabboussi F., Hamze M., Eveillard M., Lemarie C., Mallat H., Rolain J.M., Joly-Guillou M.L., Kempf M.: First report of bla(NDM-1)-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. *Int. J. Infect. Dis.* **21**, 21–23 (2014)
88. Rajamohan G., Srinivasan V.B., Gebreyes W.A.: Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1919–1925 (2010)
89. Rao R.S., Karthika R.U., Singh S.P., Shashikala P., Kanungo R., Jayachandran S., Prashanth K.: Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J. Med. Microbiol.* **26**, 333–337 (2008)
90. Revathi G., Siu L.K., Lu P.L., Huang L.Y.: First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, e1255–1258 (2013)
91. Ribera A., Roca I., Ruiz J., Gibert I., Vila J.: Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 477–480 (2003)
92. Riccio M.L., Franceschini N., Boschi L., Caravelli B., Cornaglia G., Fontana R., Amicosante G., Rossolini G.M.: Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1229–1235 (2000)
93. Robledo I.E., Aquino E.E., Sante M.I., Santana J.L., Otero D.M., Leon C.E., Vazquez G.J.: Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1354–1357 (2010)
94. Roca I., Marti S., Espinal P., Martinez P., Gibert I., Vila J.: CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4013–4014 (2009)
95. Rodriguez-Martinez J.M., Nordmann P., Ronco E., Poirel L.: Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3484–3488 (2010)
96. Rosenfeld N., Bouchier C., Courvalin P., Perichon B.: Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2504–2510 (2012)
97. Rumbo C., Tomas M. i wsp.: Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 5247–5257 (2013)
98. Saavedra S.Y., Cayo R., Gales A.C., Leal A.L., Saavedra C.H.: Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: a case report. *Braz. J. Infect. Dis.* **18**, 678–680 (2014)
99. Salazar De Vegas E.Z., Nievesm B., Ruiz M., Ruiz J., Vila J., Maria A., Elsa V.: Molecular epidemiology and characterization of resistance mechanisms to various antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii* isolated in Merida, Venezuela. *Med. Sci. Monit.* **13**, BR89–94 (2007)
100. Scaife W., Young H.K., Paton R.H., Amyes S.G.: Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**, 585–586 (1995)
101. Smani Y., Pachon J.: Loss of the OprD homologue protein in *Acinetobacter baumannii*: impact on carbapenem susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 677 (2013)
102. Srinivasan V.B., Rajamohan G., Gebreyes W.A.: Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 5312–5316 (2009)
103. Su X.Z., Chen J., Mizushima T., Kuroda T., Tsuchiya T.: AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4362–4364 (2005)
104. Tamayo-Legorreta E.M., Garza-Ramos U., Barrios-Camacho H., Sanchez-Perez A., Galicia-Paredes A., Meza-Chavez A., Silva-Sanchez J.: Identification of OXA-23 carbapenemases: novel variant OXA-239 in *Acinetobacter baumannii* ST758 clinical isolates in Mexico. *New Microbes. New Infect.* **2**, 173–174 (2014)
105. Tian G.B., Adams-Haduch J.M., Taracila M., Bonomo R.A., Wang H.N., Doi Y.: Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 confers resistance to cefepime. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4922–4925 (2011)
106. Todorova B., Velinov T., Ivanov I., Dobрева E., Kantardjiev T.: First detection of OXA-24 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bulgaria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 1427–1430 (2014)
107. Tsakris A., Ikonomidis A., Pournaras S., Tzouveleakis L.S., Sofianou D., Legakis N.J., Maniatis A.N.: VIM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 981–983 (2006)
108. Turton J.F., Ward M.E., Woodford N., Kaufmann M.E., Pike R., Livermore D.M., Pitt T.L.: The role of ISAbal1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**, 72–77 (2006)
109. Viehman J.A., Nguyen M.H., Doi Y.: Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs*. **74**, 1315–1333 (2014)
110. Wang H., Guo P., Sun H., Wang H., Yang Q., Chen M., Xu Y., Zhu Y.: Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 4022–4028 (2007)
111. Wroblewska M.M., Towner K.J., Marchel H., Luczak M.: Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 490–496 (2007)
112. Yamamoto M., Nagao M., Matsumura Y., Matsushima A., Ito Y., Takakura S., Ichiyama S.: Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying bla(IMP-19) among *Acinetobacter* species in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2480–2483 (2011)
113. Yum J.H., Yi K., Lee H., Yong D., Lee K., Kim J.M., Rossolini G.M., Chong Y.: Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla(VIM-2) gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 837–840 (2002)
114. Zhang C., Song H. i wsp.: Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. *PLoS One*, **8**, e64857 (2014)

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 4, 407–414
<http://www.pm.microbiology.pl>

METODY OPARTE NA AMPLIFIKACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH W DIAGNOSTYCE WYBRANYCH CHORÓB PRZENOSZONYCH DROGĄ PŁCIOWĄ

Beata Młynarczyk-Bonikowska^{1*}, Ewa Skulska¹, Magdalena Malejczyk¹, Sławomir Majewski²

¹ Zakład Diagnostyki Chorób Przenoszonych Drogą Płciową Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

² Klinika Dermatologii i Wenerologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Wpłynęło w listopadzie 2014 r.

1. Wstęp. 2. Metoda PCR i jej modyfikacje, które znalazły zastosowanie w diagnostyce STI. 3. Opryszczka narządów płciowych. 4. Zakażenia genitalnymi HPV. 5. Rzeżączka. 6. Zakażenia *Chlamydia trachomatis*. 7. Kiła. 8. Równoczesne wykrywanie kilku patogenów. 9. Podsumowanie

Nucleic acid amplification methods in laboratory diagnostics of selected sexually transmitted diseases

Abstract: Sexually transmitted diseases (STDs) are common in the world's human population and are often asymptomatic. On the other hand, STDs are highly infective and connected with considerable morbidity and mortality. Therefore, using fast, sensitive and specific diagnostic methods is especially important. Polymerase chain reaction – PCR, invented thirty years ago by the Nobel prize winner Carry Mullis, revolutionized many fields of biological sciences, including laboratory diagnostics of infectious diseases. In this review, we discuss the application of nucleic acid amplification techniques (NAATs), including PCR, multiplex PCR, real time PCR and HDA-helicase dependent amplification, in the laboratory diagnostics of sexually transmitted diseases. Nucleic acids amplification tests are widely used in diagnostics of some STD-like genital herpes, *Chlamydia trachomatis* infection and gonorrhoea. In other diseases, like genital HPV infections, NAATs are used only in some indications. In the case of syphilis, there are no commercial tests and it was proven that NAATs are not sensitive and specific enough to be used routinely as a substitute to serologic methods. We compare NAATs with some other methods used in laboratory diagnostics of individual diseases, like serology, culture or direct immunofluorescence. In addition, we discuss limitations of the NAATs i.e. problems with their specificity in diagnostics of pharyngeal gonorrhoea. We also present the recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and International Union Against Sexually Transmitted Diseases (IUSTI).

1. Introduction. 2. PCR method and its modifications which can be applied in diagnostics of STIs. 3. Genital herpes. 4. Infections with genital HPVs. 5. Gonorrhoea. 6. Chlamydia trachomatis infections. 7. Syphilis. 8. Simultaneous detection of several pathogens. 9. Summary

Słowa kluczowe: choroby przenoszone drogą płciową, kiła, NAATs, opryszczka narządów płciowych, rzeżączka, zakażenia genitalnymi HPV, zakażenia *Chlamydia trachomatis*

Key words: *Chlamydia trachomatis* infection, genital herpes, genital HPV infection, gonorrhoea, NAATs, sexually transmitted diseases, syphilis

1. Wstęp

Choroby przenoszone drogą płciową są jednymi z najczęstszych chorób zakaźnych występujących w światowej populacji. Nierzadko są bezobjawowe, a z drugiej strony zwykle charakteryzują się dużą zakaźnością i mogą być istotną przyczyną śmiertelności i chorobowości. Mogą być przyczyną bezpłodności, a także przenosić się wewnątrzmacicznie i/lub okołoporodowo na płód i noworodka.

Od czasu, gdy w 1983 Kary Mullis, późniejszy laureat nagrody Nobla, opracował metodę łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR, minęło już ponad trzydzieści lat. Obecnie trudno wyobrazić sobie funkcjonowanie wielu dziedzin, w tym diagnostyki chorób zakaźnych,

bez metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych (NAATs-nucleic acid associated techniques) [33].

Istnieje ponad 30 patogenów, które mogą przenosić się drogą kontaktów seksualnych. W pracy omówiono zastosowanie NAATs w tym PCR, multiplex PCR, real time PCR oraz HDA (helicase dependent amplification) w diagnostyce najczęściej występujących w Polsce chorób przenoszonych drogą płciową, takich jak zakażenia genitalnymi HPV, opryszczka narządów płciowych, zakażenie *Chlamydia trachomatis*, rzeżączka i kiła. Diagnostyka niektórych z tych chorób np. zakażeń *C. trachomatis*, rzeżączki czy opryszczki narządów płciowych wiąże się z szerokim zastosowaniem NAATs. W przypadku innych np. zakażeń genitalnymi typami wirusów brodawczaka ludzkiego (*Human papillomavirus*

* Autor korespondencyjny: Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Koszykowa 82a, 02-008 Warszawa; tel.: 22 5021313; beata.mlynarczyk@wum.edu.pl

– HPV) – NAATs mogą być wykorzystywane w pewnych, konkretnych wskazaniach. W innych chorobach przenoszonych drogą płciową takich jak kiła, NAATs wciąż nie znalazły komercyjnego zastosowania.

Przedstawiono również najważniejsze zalecenia IUSTI (International Union Against Sexually Transmitted Infections) i CDC (Centers for Disease Control and Prevention) dotyczące udziału metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych w diagnostyce chorób przenoszonych drogą płciową.

Praca nie obejmuje zakażeń HIV, jako że jest to obszerny temat, który wymagałby odrębnego opracowania.

2. Metoda PCR i jej modyfikacje, które znalazły zastosowanie w diagnostyce STI

PCR jest bardzo czułą metodą pozwalającą na wykrycie dowolnego fragmentu DNA (np. charakterystycznego dla danego patogenu) w badanym (np. wyizolowanym z materiału pobranego od chorego) materiale biologicznym. W reakcji, poza badanym (matrycowym) DNA uczestniczą tzw. primery (startery – krótkie fragmenty DNA komplementarne do sekwencji znajdujących się na początku i końcu poszukiwanego genu), mieszanka nukleotydów oraz oporna na podgrzewanie polimeraza DNA. Pierwszym do tego celu użytym enzymem była, obecnie wciąż stosowana, polimeraza Taq pochodząca od żyjących w gorących źródłach bakterii *Thermus aquaticus*. Obecnie stosuje się również inne polimerazy [26, 33].

Poszczególne etapy reakcji powtarzają się cyklicznie i zachodzą w różnych temperaturach. W celu uzyskania możliwie największej liczby kopii powielanego odcinka DNA wykonuje się zazwyczaj 30–40 cykli. Ponieważ jako matryce do reakcji wykorzystywane są wszystkie dotychczas zsyntetyzowane cząsteczki genu – nici DNA, amplifikacja przebiega coraz szybciej, w postępie geometrycznym. W klasycznym PCR zwielokrotniony fragment DNA jest następnie wykrywany za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym (wybarwiony bromkiem etydyny fragment DNA świeci w świetle UV) lub przy użyciu metod immunodetekcji z wykorzystaniem reakcji hybrydyzacji (powstałe amplikony hybrydują z sondami na zasadzie komplementarności zasad w DNA) i metody ELISA (utworzone hybrydy wykrywane są w reakcji immunoenzymatycznej) [26].

Obecnie dążenie do skrócenia i uproszczenia PCR doprowadziło do powstania wielu modyfikacji klasycznej metody. Coraz szerzej stosowana jest, opisana w 1992 przez Higuchi i wsp. metoda real time PCR, w której do środowiska reakcji wprowadza się znakowane barwnikami fluorescencyjnymi sondy molekularne, komplementarne do powielanej sekwencji lub barwniki wbudowujące się do dwuniciowego DNA,

co pozwala na śledzenie w czasie rzeczywistym ilości produktu powstającego w kolejnych cyklach. Dzięki temu wynik testu można odczytać w trakcie amplifikacji, a etap elektroforezy został wyeliminowany [9, 21]. Powstały również szybkie testy oparte na amplifikacji zależnej od helikazy (HDA – helicase dependent amplification), w których amplifikacja DNA może odbywać się w stałej temperaturze [22]. Metoda oparta na równoczesnym wykrywaniu kilku fragmentów DNA to tzw. multiplex PCR. Można w ten sposób wykrywać kilka patogenów równocześnie lub zwiększyć czułość i swoistość wykrywania pojedynczego drobnoustroju. Ważne jest odpowiednie dobranie starterów – muszą one mieć podobną długość, zbliżone temperatury reakcji i być swoiste dla poszukiwanego patogenu w celu uniknięcia reakcji krzyżowych [11].

3. Opryszczka narządów płciowych

Opryszczka narządów płciowych przenosi się praktycznie wyłącznie przez kontakty seksualne a czynnikiem wywołującym jest ludzki herpeswirus (*Human herpesvirus* – HHV2) lub rzadziej HHV1. Dawna, zwyczajowa nazwa tych patogenów to wirus opryszczki pospolitej (Herpes simplex virus – HSV) typ 1 i 2 [30]. Około 20% światowej populacji (10–60% w różnych subpopulacjach) ma przeciwciała przeciw HHV2. Zakażenie HHV jest najczęstszą przyczyną owrzodzeń na narządach płciowych. Około 20% wszystkich zakażeń wiąże się z okresowym występowaniem typowych objawów klinicznych w postaci bolesnych pęcherzyków na podłożu rumieniowym w okolicy anogenitalnej. Pozostałe przypadki to zakażenia o nietypowym przebiegu, subkliniczne lub bezobjawowe. Głównym problemem jest pozostawanie wirusa w organizmie osoby zakażonej do końca życia, co wiąże się z możliwością wystąpienia objawowych nawrotów oraz z ryzykiem zakażenia partnera seksualnego i odmatczywego zakażenia noworodka. Wykazano znaczny wpływ współistnienia opryszki narządów płciowych na zwiększenie ryzyka transmisji zakażenia HIV. Zakażenie HHV, dotyczące narządów płciowych, jest również dodatkowym czynnikiem ryzyka wystąpienia raka szyjki macicy u kobiet zakażonych onkogennymi typami HPV [19, 31]. Na podstawie objawów klinicznych nie można jednoznacznie odróżnić zakażenia HHV1 od HHV2 i nie zawsze można odróżnić zakażenie pierwotne od nawrotowego [19].

W diagnostyce laboratoryjnej zakażeń HHV okolicy genitalnej najważniejszą rolę odgrywają badania oparte na poszukiwaniu wirusów w materiale od pacjentów, podczas gdy serologia ma znaczenie uzupełniające i jest wskazana tylko w niektórych przypadkach (np. badania epidemiologiczne lub badania bezobjawowych partne-

rów osób zakażonych) [4, 10, 37]. IUSTI i CDC zalecają poszukiwanie wirusów metodą PCR (IUSTI zaleca real time PCR) u wszystkich chorych ze zmianami na narządach płciowych podejrzanych o zakażenie HHV. Jako metoda alternatywna wymieniana jest hodowla z ustaleniem typu HHV (1 lub 2) metodą immunoenzymatyczną. PCR jest wskazana na pierwszym miejscu jako metoda czulsza, łatwiejsza w wykonaniu i szybsza. Metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych są również mniej wymagające jeśli chodzi o transport i przechowywanie próbek niż hodowla wirusa, ponieważ wykrywają także HHV niezdolne do replikacji. Pomimo, że NAATs są metodami mogącymi wykryć bezobjawowy wysiew wirusa rutynowe badania w tym kierunku nie są zalecane ze względu na trudności z uchwyceniem tego nieciągłego zjawiska [4, 10, 37].

NAATs są stosowane w diagnostyce opryszczki przez wiele laboratoriów. Najczęściej poszukuje się genów kodujących glikoproteiny otoczki wirusa (tj. gG lub gB) [5, 13]. Ich sekwencja pozwala na odróżnienie HHV1 od HHV2. Większość laboratoriów stosuje samodzielnie opracowane testy, które charakteryzują się nierzadko wysoką, ale różniącą się w różnych ośrodkach czułością i swoistością [1, 40]. Bardziej porównywalne są wyniki testów komercyjnych. Dostępny jest między innymi komercyjny test real time PCR (ostatnio zatwierdzony przez FDA) BD ProbeTec HSV Qx (HSVQx) [45], a od niedawna także test oparty na amplifikacji zależnej od helikazy (HDA helicase dependent amplification-IsoAmp[®] HSV Assay), w którym reakcja odbywa się w stałej temperaturze, co znacznie obniża koszty [22]. Oba testy są czulsze niż stanowiąca wcześniej „złoty standard” hodowla wirusa (ELVIS[®] HSV ID/typing (shell-vial culture and DFA) (według różnych badań o 11–71%), odznaczają się wysoką swoistością, a wyniki z różnych laboratoriów są porównywalne [29].

4. Zakażenia genitalnymi HPV

Zakażenia genitalnymi wirusami brodawczaka ludzkiego (*Human papillomavirus* – HPV) są uważane za najczęstszą chorobę przenoszoną drogą płciową. Zmiany kliniczne powodowane przez te wirusy dotyczą około 1% aktywnej seksualnie populacji, a znacznie wyższy odsetek ma zakażenie subkliniczne lub bezobjawowe. HPV niskiego ryzyka powodują kłykciny kończyste, kłykciny olbrzymie oraz większość przypadków brodawczaków krtani, a HPV wysokiego ryzyka stany przednowotworowe i raki szyjki macicy (prawie 100%) oraz okolicy anogenitalnej (50–85%), w mniejszym stopniu także głowy i szyi [14, 43, 48, 50].

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń HPV opiera się głównie na poszukiwaniu materiału genetycznego

wirusa metodą hybrydyzacji lub PCR, w obu metodach z wykonaniem genotypowania, czyli określeniem typu wirusa wykrytego w badanym materiale. Wykrycie konkretnego typu wirusa pozwala na ustalenie czy infekcja ma charakter przetrwały, czyli czy ten sam typ HPV (szczególnie HR – high risk – wysokiego ryzyka) jest wykrywany w dwóch badaniach wykonanych w ciągu pół roku do roku. Stwierdzenie występowania infekcji przetrwałej oznacza, że w 45% przypadków nastąpi w ciągu 5 lat rozwój zmian typu CIN 2/3 (cervical intraepithelial neoplasia – śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy) [3, 7, 12, 42]. Znaczenie ma również wykrywanie transkryptów mRNA dla wirusowych białek E6/E7, uczestniczących w onkogenezie, związanej z zakażeniami HPV. Obecność mRNA dla tych białek wyraźnie sugeruje przetrwałą infekcję u pacjentki. Ze względu na to, że HPV mogą przebywać na błonach śluzowych narządów płciowych nie wywołując żadnych objawów klinicznych, a następnie być eliminowane przez układ odpornościowy osoby zakażonej, wyniki badań w kierunku zakażenia różnymi typami HPV należy interpretować wyłącznie razem z obrazem klinicznym oraz wynikami cytologii lub badania histopatologicznego [4, 49].

CDC zaleca wykonywanie typowania genetycznego HPV u kobiet > 25 roku życia z wynikiem cytologii ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance – atypowe komórki nabłonkowe nieokreślonego znaczenia), oraz u kobiet w wieku 30–65 lat jako badania przesiewowego wykonywanego równocześnie z cytologią. W przypadku ujemnego wyniku obu testów zalecane jest powtórzenie badań przesiewowych po 5 latach. Alternatywnie można w tej grupie wiekowej wykonywać przesiewowo samą cytologię raz na 3 lata. Typowanie HPV nie jest zalecane u kobiet < 25 roku życia, raczej nie powinno również być wykonywane samodzielnie jako badanie przesiewowe. U kobiet między 21 a 30 rokiem życia jako badanie przesiewowe zalecana jest cytologia wykonywana co 3 lata, a u kobiet młodszych niż 21 lat CDC nie zaleca badań przesiewowych. Powyższe zalecenia wynikają z faktu, że u bardzo młodych kobiet zakażenie HPV wysokiego ryzyka jest częstsze niż w późniejszym wieku, a jednocześnie zwykle nie ma żadnych konsekwencji klinicznych (wirusy są eliminowane) [4]. Według zaleceń IUSTI i CDC nie ma wskazań do badania w kierunku typu HPV u chorych z typowymi klinicznie kłykcynami kończystymi ani u partnerów kobiet ze stwierdzonym zakażeniem HPV [4, 23].

Praca porównująca 3 komercyjne testy: oparty na hybrydyzacji DNA Hybrid Capture 2 oraz wykorzystujące metodę real time PCR: Abbott Real Time High-Risk Human Papillomavirus (HPV), Roche Cobas wykazała, że HPV HC2 jest metodą czulszą (96,6%), ale mniej swoistą (89,1%) niż metody oparte na real

time w wykrywaniu HPV wysokiego ryzyka. Badane metody Real Time HR i Cobas HPV wykazały odpowiednio czułość 78,3% i 91,7% oraz swoistość 99,2% i 97% [3]. Inne badania porównują INNO-LiPA HPV genotyping extra assay z multiplex PCR dla różnych typów onkogennych HPV. Oba badania wykazują się wysoką swoistością i czułością (nieznacznie czulszy okazał się real time PCR) [12].

Dostępne są również komercyjne testy pozwalające na wykrywanie transkryptów mRNA dla białek E6/E7 HPV wysokiego ryzyka. Do takich testów należą np. NucliSENS EasyQ®, pozwalający na wykrycie mRNA 5 najczęstszych typów HPV-16, 18, 31, 33, 45 oraz Aptima HPV test dla HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, i 68. Badania porównujące powyższe testy i HPV HC2 wykazały, że testy Aptima HPV i HPV HC2 mają zbliżoną czułość, przy niższej czułości NucliSENS EasyQ®. Swoistość zarówno Aptima HPV i NucliSENS EasyQ® w wykrywaniu i przewidywaniu pojawienia się zmian na szyjce macicy wywołanych przez onkogenne HPV była wyższa niż HPV HC2 [35, 38]. Testy o wyższej swoistości, szczególnie testy wykrywające RNA dla E6/7 HPV wysokiego ryzyka prawdopodobnie mogłyby prawdopodobnie znaleźć zastosowanie w diagnostyce przesiewowej u kobiet po 30 roku życia jako samodzielne badania bez równoczesnego wykonywania cytologii, jednak wciąż nie znalazło to odzwierciedlenia w oficjalnych zaleceniach.

Testy, które nie pozwalają na wykrycie konkretnego typu HPV, a w których wykrywane są łącznie typy onkogenne i nieonkogenne lub podgrupy w obrębie tych grup, nie mają oczekiwanego znaczenia diagnostycznego – nie pozwalają na wykrycie infekcji przetrwałej. Większość producentów podaje, że testy służą do badania wymazów z kanału szyjki macicy, co stawia pod pewnym znakiem zapytania czułość i swoistość badań pobranych z innych lokalizacji tj. cewka moczowa czy odbytu lub materiał biopsyjny. Istnieją również liczne testy opracowane przez laboratoria, często pozwalające na badanie materiału innego niż wymaz z szyjki macicy i/lub dokładne typowanie wirusów [39, 41].

5. Rzeżączka

Zakażenie *Neisseria gonorrhoeae* jest drugą, biorąc pod uwagę częstość występowania, bakteryjną chorobą przenoszoną drogą płciową po zakażeniu *C. trachomatis* i pierwszą pod względem liczby nowych przypadków. Według danych WHO globalna liczba przypadków rzeżączki w 2008 roku wynosiła ponad 106 milionów i przekroczyła liczbę przypadków zakażeń *C. trachomatis* w tym samym roku [46].

Zakażenie *N. gonorrhoeae* jest przyczyną zapalenia cewki moczowej, zapalenia szyjki macicy, zapalenia

odbytu i zapalenia gardła. Noworodki zakażone okołoporodowo mają objawy ciężkiego zapalenia spojówek. Nieleczona rzeżączka może prowadzić m.in. do zapalenia najądrza u mężczyzn, stanów zapalnych narządów miednicy mniejszej i ciąży pozamaciczych u kobiet oraz do bezpłodności u obu płci [47].

NAATs są obok hodowli metodą zalecaną przez IUSTI i CDC w diagnostyce zakażeń *N. gonorrhoeae*. Według IUSTI optymalne jest stosowanie obu metod równolegle. CDC zaleca w pierwszej kolejności NAATs, a w przypadku ponownego wykrycia patogenu 7 dni po leczeniu (podejrzanie niepowodzenia w leczeniu) wykonanie hodowli i określenie lekowrażliwości [36]. Metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych odznaczają się zwykle wysoką czułością, co umożliwia wykrywanie nawet niewielkiej liczby bakterii np. w moczu lub wymazie z pochwy, podczas gdy w przypadku hodowli konieczne jest bardziej precyzyjne pobranie materiału (w przypadku typowej lokalizacji – wymaz z szyjki macicy i cewki moczowej u kobiet oraz z cewki moczowej u mężczyzn). Hodowla jest również metodą bardziej wymagającą jeśli chodzi o transport i przechowywanie pobranych próbek. Z drugiej strony NAATs, w przeciwieństwie do hodowli, nie pozwalają na łatwe oznaczenie wrażliwości *N. gonorrhoeae* na antybiotyki. Biorąc pod uwagę rosnącą oporność dwoinek rzeżączki na stosowane leki, również w Polsce, możliwość taka może mieć duże znaczenie [2, 4, 6, 32].

Innym problemem jest swoistość NAATs. W jednym z badań porównano czułość i swoistość sześciu komercyjnie dostępnych testów opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych: Gen-Probe APTIMA COMBO 2, APTIMA GC, Roche COBAS Amplicor CT/NG, COBAS 4800 CT/NG testy, BD ProbeTec GC Qx amplified DNA assay i Abbott RealTime CT/NG. Zbadano 450 izolatów, w tym 234 dwoinek rzeżączki, a pozostałe innych gatunków należących do rodzaju *Neisseria* lub innych zbliżonych genetycznie bakterii. Jak można było przewidzieć, niemal wszystkie testy (oprócz COBAS Amplicor CT/NG, który nie wykrył 1.9% próbek) odznaczały się 100% czułością. Jednak wszystkie testy dawały pewien odsetek wyników fałszywie pozytywnych w przypadku badania izolatów innych niż dwoinki rzeżączki. Wyniki te były różne w przypadku różnych testów i wynosiły odpowiednio 14.1%, 11%, 2.1%, 1.7%, 1% i 1% dla COBAS Amplicor, ProbeTec, APTIMA COMBO 2, APTIMA GC, Abbott RealTime i Roche COBAS 4800. Autorzy pracy zalecają dodatkowe badania potwierdzające w przypadku wykrycia *N. gonorrhoeae* metodami opartymi o amplifikację kwasów nukleinowych, szczególnie jeśli próbki pochodzą z okolic innych niż narządy płciowe np. z gardła (wysokie ryzyko występowania gatunków należących do rodzaju *Neisseria*, innych niż *N. gonorrhoeae*) [44].

6. Zakażenia *Chlamydia trachomatis*

Zakażenie okulogenitalnymi typami *C. trachomatis* jest najczęstszą bakteryjną chorobą przenoszoną drogą płciową. Podobnie jak dwoinki rzeżączki, *C. trachomatis* wywołuje zapalenie cewki moczowej, szyjki macicy, odbytu i gardła. Często osoby zakażone, szczególnie kobiety (ok. 70–90%) oraz mężczyźni homo- i biseksualiści z zapaleniem odbytu lub gardła, nie zauważają żadnych objawów klinicznych. Okołoporodowe zakażenie noworodka może wiązać się z zapaleniem płuc i zapaleniem spojówek. Wśród powikłań należy wymienić zapalenie najądrza u mężczyzn, stany zapalne narządów miednicy mniejszej u kobiet oraz bezpłodność u obu płci. Ponadto u osób zakażonych *C. trachomatis* może wystąpić tzw. zespół Reitera. Współistnienie zakażenia *C. trachomatis* zwiększa ryzyko wystąpienia raka szyjki macicy u kobiet zakażonych onkogennymi HPV [46, 47].

NAATs odgrywają ważną rolę w diagnostyce zakażeń *C. trachomatis* i są jedyną metodą zalecaną przez IUSTI i CDC. CDC podkreśla konieczność zachowania możliwości prowadzenia hodowli przez niektóre laboratoria [4, 24, 36]. Za stosowaniem metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych przemawia ich wysoka czułość, pozwalająca na wykrywanie patogenu w próbkach moczu u mężczyzn i samodzielnie pobranym wymazie z pochwy u kobiet (podczas gdy w przypadku immunofluorescencji konieczne są wymazy z cewki moczowej lub szyjki macicy). Również w przypadku materiału pobranego z nietypowych miejsc np. odbytu czy gardła czułość PCR jest znacznie wyższa niż innych metod. NAATs mają jednak również pewne ograniczenia. Na podstawie standardowych testów zwykle trudno jest odróżnić zakażenie okulogenitalnymi typami *C. trachomatis* od zakażenia typami powodującymi ziarnicę weneryczną pachwin. To ostatnie zakażenie może zdarzyć się zwłaszcza u MSM (men having sex with men) i w przypadku jego podejrzenia zalecane jest genotypowanie. W przypadku kobiet wymazy są lepszym materiałem niż próbki moczu, ponieważ obecne w moczu czynniki hamujące mogą być przyczyną wyników fałszywie ujemnych [4, 6, 24, 25].

Dostępne są liczne testy komercyjne oraz opracowane przez laboratoria. Większość komercyjnie stosowanych testów jest oparta na wykrywaniu sekwencji w obrębie plazmidu lub chromosomalnego genu dla MOMP (major outer membrane proteine – główne białko błony zewnętrznej). Opisano szczepy *C. trachomatis*, które nie posiadają plazmidu, a także szczepy z delecją 377 par zasad w obrębie plazmidu, obejmującą fragment badany za pomocą komercyjnych testów – tzw. wariant szwedzki i oba przypadki nie będą wykrywane przez niektóre NAATs [27].

Wciąż poszukiwana jest czuła, swoista i szybka metoda wykrywania zakażeń *C. trachomatis*. Ciekawym

rozwiązaniem wydaje się niedawno opisany test multiplex PCR wykrywający 9 różnych loci w genomie *C. trachomatis*. Procedura od pobrania materiału do uzyskania wyniku trwa ok. 1 godziny. W badaniu dotyczącym materiału pobranego z szyjki macicy od 263 kobiet z wysokim ryzykiem zakażenia, wykazano wysoką czułość i swoistość tej metody w porównaniu z komercyjnym testem Roche Amplicor NAAT. W odniesieniu do bardzo czułej i swoistej, ale komercyjnie nie stosowanej metody sekwencjonowania genów, czułość wynosiła 91,5% i 62,3%, a swoistość 100% i 95, 9% odpowiednio dla multiplex PCR i Amplicor NAATs [8].

7. Kiła

Kiła jest ogólnoustrojową chorobą przenoszoną drogą płciową wywoływaną przez krętki blade – *Treponema pallidum*. Według szacunkowych danych WHO liczba zakażeń na świecie w 2008 r. wynosiła 10,6 mln. W diagnostyce kiły najważniejszą rolę odgrywają metody serologiczne oparte na badaniach przeciwciał przeciwkrętkowych we krwi chorych. W badaniach przesiewowych wykorzystuje się najczęściej odczynny tzw. niekrętkowe, takie jak VDRL (Venereal Disease Research Laboratory),USR (unheated serum reagin test) lub RPR (rapid plasma reagin). Ich dodatni wynik bywa czasem nieswoisty i zawsze powinien być potwierdzony przez odczynny z antygenami krętkowymi, takimi jak FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test, test immunofluorescencji z absorpcją przeciwciał przeciw krętkom saprofitycznym), ilościowe FTA, odczyn hemaglutynacji biernej (TPHA) lub odczynny immunoenzymatyczny [4, 15].

Poszukiwanie antygeny (krętków lub ich materiału genetycznego) może mieć znaczenie w przypadku występowania zmian klinicznych, z których można pobrać materiał, szczególnie we wczesnym okresie choroby, gdy występuje objaw pierwotny a odczynny serologiczne są jeszcze ujemne. Obecnie materiał pobrany z owrzodzeń na błonach śluzowych od pacjentów z podejrzeniem kiły badany jest najczęściej w mikroskopie z ciemnym polem widzenia lub za pomocą immunofluorescencji bezpośredniej. Pomimo, że nie ma dostępnych w sprzedaży NAATs do wykrywania krętków bladych, niektóre laboratoria stosują własne testy oparte na amplifikacji materiału genetycznego. Opisano m.in. test real time PCR oparty na poszukiwaniu genu *tpp47* *T. pallidum*, który umożliwia odróżnienie krętków patogennych od saprofitycznych oraz oznaczanie ilościowe krętków w płynach ustrojowych. Inne testy oparte są na poszukiwaniu genu dla polimerazy DNA (PolA) oraz 23S rRNA. Wykazano wysoką czułość (75–82%) i swoistość (95%) tych testów w przypadku materiału pobranego z owrzodzeń u chorych

z kiłą wczesną. Czulość badań z krwi jest zbyt niska (odpowiednio 29% z wyizolowanych z krwi leukocytów – PMBC, 14% z surowicy i 24% z pełnej krwi) [18], by testy te mogły w przyszłości zastąpić odczyny serologiczne. Inne badanie wykonywane u chorych z kiłą wczesną objawową wykazało czulość 50% w kile II okresu, natomiast nie wykryto materiału genetycznego *T. pallidum* w żadnej próbce krwi od chorych z kiłą I okresu [28]. Podobne wyniki uzyskano analizując zbiorczo 69 badań oceniających przydatność PCR w diagnostyce kiły. Badania wymazów z owrzodzeń pierwotnych wykazywały czulość ponad 78% i swoistość prawie 97%, a badania próbek krwi noworodków z kiłą wrodzoną charakteryzowały się czulością 83% przy swoistości 88%. Czulość badań krwi u dorosłych różniła się zależnie od okresu choroby, jednak zwykle nie przekraczała 50% i była dużo niższa niż czulość badań serologicznych [17]. Wyniki PCR mogą nie być w pełni miarodajne w ocenie skuteczności leczenia, ze względu na niską czulość badań z płynów ustrojowych, a także dlatego, że materiał genetyczny krętków może utrzymywać się w płynie mózgowo-rdzeniowym długo po skutecznym leczeniu kiły układu nerwowego; w pojedynczych przypadkach był wykrywalny po 3 latach [17, 18, 28].

8. Równoczesne wykrywanie kilku patogenów

Testy wykrywające jednocześnie kilka fragmentów DNA (multiplex PCR) mogą pozwalać na równoczesne oznaczanie w materiale klinicznym kilku patogenów przenoszonych drogą płciową, co może przyspieszyć i ułatwić diagnostykę. W jednej z publikacji opisano opracowany przez autorów test wykrywający HPV 16/18 i HHV1/2. Zbadano 177 próbek pobranych z szyjki macicy od pacjentek z podejrzeniem zakażenia HPV i HHV. Badanie wykazało się 100% czulością dla wszystkich badanych wirusów. Swoistość wynosiła odpowiednio 97,1% i 98,1% dla HPV 16 i 18 oraz 97,0% i 96,0% dla HHV1 i 2 [49].

Inne badania oceniały czulość i swoistość komercyjnego testu Abbott RealTime CT/NG wykrywającego *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*. Zbadano 3832 próbki od osób obu płci, w tym mocz, wymazy z szyjki macicy i z cewki moczowej oraz samodzielnie pobrane przez pacjentki wymazy z pochwy. Czulość testu wynosiła 92,4% i 96,9%, a swoistość 99,2% i 99,7% odpowiednio dla *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* [16]. Inny opracowany przez laboratorium test multiplex PCR ma równocześnie wykrywać *Neisseria gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *T. pallidum* oraz HHV 1 i 2 w materiale od pacjentów. Jego czulość i swoistość oceniono badając wymazy z pochwy od 80 afrykańskich pacjentek z bezpłodno-

ścią. Czulość testów w porównaniu z metodami referencyjnymi wyniosła 100% dla *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium* i HHV2, a swoistość 100% dla *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, 90,2 % dla *T. vaginalis* i 96,1 dla HHV2. W badanej grupie nie było dodatknych próbek dla *T. pallidum* i HHV1. Wyniki wskazują na czulość i swoistość badanego testu zbliżoną do innych NAATs badających obecność mniejszej liczby patogenów, jednak dokładna ocena testu wymaga większej liczby badanych próbek [34].

Mimo powyższych obiecujących wyników, testy multiplex PCR wykrywające kilka patogenów przenoszonych drogą płciową powinny być używane z ostrożnością. W przypadku współistnienia kilku patogenów i przy różnej ich ilości w badanym materiale opisywano wyniki fałszywie ujemne dla tych patogenów, których w próbce było mniej. Jeśli podejrzewamy, że zachodzi taka sytuacja, zalecane jest stosowanie testów wykrywających pojedyncze patogeny [20].

9. Podsumowanie

W podsumowaniu metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych odgrywają coraz większą rolę w diagnostyce chorób przenoszonych drogą płciową, co znalazło odzwierciedlenie w zaleceniach IUSTI i CDC. W przypadku większości chorób przenoszonych drogą płciową wykazano wyższą czulość NAATS niż metod tradycyjnych. Wyjątkiem w tym przypadku są badania serologiczne w diagnostyce kiły.

Możliwość hodowli niektórych patogenów (szczególnie *N. gonorrhoeae*, ale również *C. trachomatis* czy HHV) powinna być zachowana ze względu na badania epidemiologiczne i oznaczanie wrażliwości na leki.

Piśmiennictwo

1. Aumakhan B., Gaydos C.A. i wsp.: Genital herpes evaluation by quantitative TaqMan PCR: correlating single detection and quantity of HSV-2 DNA in cervicovaginal lavage fluids with cross-sectional and longitudinal clinical data. *Viol. J.* 7, 1–8 (2010)
2. Bignell C., Unemo M.: 2012 European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoea in Adults http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2012/Gonorrhoea_2012.pdf, 1–24 (2012)
3. Carozzi F., Bisanzzi S., Sani C., Zappa M., Cecchini S., Ciatto S., Confortini M.: Agreement between the AMPLICOR Human Papillomavirus Test and the Hybrid Capture 2 assay in detection of high-risk human papillomavirus and diagnosis of biopsy-confirmed high-grade cervical disease. *J. Clin. Microbiol.* 45, 364–369 (2007)
4. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2015. *MMWR Recomm. Rep.* 64, 1–137 (2015)

5. Corey L., Huang M.L., Selke S., Wald A.: Differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 in clinical samples by a real-time taqman PCR assay. *J. Med. Virol.* **76**, 350–355 (2005)
6. Cosentino L.A., Campbell T., Jett A., Macio I., Zamborsky T., Cranston R.D., Hillier S.L.: Use of nucleic acid amplification testing for diagnosis of anorectal sexually transmitted infections. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2005–2008 (2012)
7. Dalstein V., Merlin S., Bali C., Saunier M., Dachez R., Ronsin C.: Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J. Virol. Methods.* **156**, 77–83 (2009)
8. Dean D., Turingan R.S., Thomann H.U., Zolotova A., Rothschild J., Joseph S.J., Read T.D., Tan E., Selden R.F.: A multiplexed microfluidic PCR assay for sensitive and specific point-of-care detection of *Chlamydia trachomatis*. *PLOS ONE*, **7**, e51685 (2012)
9. Deepak S., Kottapalli K., Rakwal R., Oros G., Rangappa K., Iwashashi H., Masuo Y., Agrawal G.: Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr. Genomics*, **8**, 234–251 (2007)
10. Domeika M., Bashmakova M., Savicheva A., Kolomiec N., Sokolovskiy E., Hallen A., Unemo M., Ballard R.C.: Eastern European network for sexual and reproductive health (EE SRH Network). Guidelines for the laboratory diagnosis of genital herpes in eastern European countries. *Euro Surveill.* **15**, 44, 1–7 (2010)
11. Edwards M.C., Gibbs R.A.: Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl.* **3**, 65–75 (1994)
12. Else E.A., Swoyer R., Zhang Y., Taddeo F.J., Bryan J.T., Lawson J., Van Hyfte I., Roberts C.C.: Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with INNO-LiPA HPV genotyping extra assay. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1907–1912 (2011)
13. Fang X.F., Song B., Tu Y.Y., Tong J.Z., Faul J.L., Bai H.: Rapid detection of glycoprotein G gene for the diagnosis and typing of herpes simplex virus infection in genital herpes. *Sex. Transm. Infect.* **75**, 396–397 (1999)
14. Forcier M., Musacchio N.: An overview of human papillomavirus infection for the dermatologist: disease, diagnosis, management, and prevention. *Dermatol. Ther.* **23**, 458–476 (2010)
15. French P., Gomberg M., Janier M., Schmidt B., van Voorst Vader P., Young H.: IUSTI/IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *Int. J. STD AIDS*, **20**, 300–309 (2009)
16. Gaydos C.A., Robinson J. i wsp.: Performance of the Abbott RealTime CT/NG for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3236–3243 (2010)
17. Gayet-Ageron A., Lautenschlager S., Ninet B., Perneger T.V., Combesure C.: Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex. Transm. Infect.* **89**, 251–256 (2012)
18. Grange P.A., Dupin N. i wsp.: Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 546–552 (2012)
19. Gupta R., Warren T., Wald A.: Genital herpes. *Lancet*, **22**, 2127–2137 (2007)
20. Hamilton M.S., Otto M., Nickell A., Abel D., Ballam Y., Schremmer R.: High frequency of competitive inhibition in the Roche Cobas AMPLICOR multiplex PCR for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4393 (2002)
21. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, **11**, 1026–1030 (1993)
22. Kim H.J., Yen-Lieberman B. i wsp.: A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Clin. Virol.* **50**, 26–30 (2011)
23. Lacey C.J., Woodhall S.C., Wikstrom A., Ross J.: 2012 European guideline for the management of anogenital warts. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **3**, e263–70 (2013)
24. Lanjouw E., Ossewaarde J.M., Stary A., Boag F., van der Meijden W.I.: 2010 European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections. *Int. J. STD AIDS*, **21**, 729–737 (2010)
25. Lister N.A., Tabrizi S.N., Fairley C.K., Garland S.: Validation of roche COBAS Amplicor assay for detection of *Chlamydia trachomatis* in rectal and pharyngeal specimens by an *omp1* PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 239–241 (2004)
26. Lorenz T.C.: Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Vis. Exp.* **22**, e3998 (2012)
27. Marions L., Rotzen-Ostlund M., Grillner L., Edgardh K., Tiveljung-Lindell A., Wikstrom A., Lidbrink P.: High occurrence of a new variant of *Chlamydia trachomatis* escaping diagnostic tests among STI clinic patients in Stockholm, Sweden. *Sex. Transm. Dis.* **35**, 1, 61–64 (2008)
28. Martin I.E., Tsang R.S., Sutherland K., Tilley P., Read R., Anderson B., Roy C., Singh A.E.: Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1668–1673 (2009)
29. Miller N.S., Yen-Lieberman B., Poulter M.D., Tang Y.W., Granato P.A.: Comparative clinical evaluation of the IsoAmp[®] HSV Assay with ELVIS[®] HSV culture/ID/typing test system for the detection of herpes simplex virus in genital and oral lesions. *J. Clin. Virol.* **54**, 355–358 (2012)
30. Młynarczyk B., Majewski S.: Zakażenia wirusami herpes simplex i varicella-zoster: patogeniza i leczenie. *Przegl. Dermatol.* **89**, 133–138 (2002)
31. Młynarczyk-Bonikowska B., Majewska A., Malejczyk M., Młynarczyk G., Majewski S.: Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part I: HSV, HPV. *Mini-Rev. Med. Chem.* **13**, 1837–1845 (2013)
32. Młynarczyk-Bonikowska B., Serwin A.B., Golparian D., Walter de Walthoffen S., Majewski S., Koper M., Malejczyk M., Domeika M., Unemo M.: Gonorrhoea epidemiology, antimicrobial susceptibility/resistance and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Poland, 2010–2012. *BMC Inf. Dis.* **14**, 65–71 (2014)
33. Mullis K.B.: Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, **48**, 579–582 (1990)
34. Muvunyi C.M., Dhont N., Verhelst R., Crucitti T., Reijmans M., Mulders B., Simons G., Temmerman M., Claeys G., Padalko E.: Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STD Finder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **71**, 29–37 (2011)
35. Oliveira A., Verdasca N., Pista Â.: Use of the NucliSENS EasyQ HPV assay in the management of cervical intraepithelial neoplasia. *J. Med. Virol.* **85**, 1235–1241 (2013)
36. Papp J.R., Schachter J., Gaydos C.A., Van Der Pol B.: Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. *MMWR*. **63**, 1–17 (2014)
37. Patel R., Alderson S., Geretti A., Nilsen A., Foley E., Lautenschlager S., Green J., van der Meijden W., Gomberg M., Moi H.: IUSTI/WHO Europe. European guideline for the management of genital herpes, 2010. *Int. J. STD AIDS*. **22**, 1–10 (2010)
38. Reid J.L., Wright T.C.Jr., Stoler M.H., Cuzick J., Castle P.E., Dockter J., Getman D., Giachetti C.: Human papillomavirus

- oncogenic mRNA testing for cervical cancer screening: baseline and longitudinal results from the CLEAR study. *Am. J. Clin. Pathol.* **144**, 473–483 (2015)
39. Roberts C.C., Swoyer R., Bryan J.T., Taddeo F.J. Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with the linear array HPV genotyping PCR assay and influence of DNA extraction method on HPV detection. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1899–1906 (2011)
 40. Schloss L., Linde A. i wsp.: An international external quality assessment of nucleic acid amplification of herpes simplex virus. *J. Clin. Virol.* **28**, 175–185 (2003)
 41. Seaman W.T., Andrews E., Couch M., Kojic E.M., Cu-Uvin S., Palefsky J., Deal A.M., Webster-Cyriaque J.: Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Virol. J.* **7**, 1–17 (2010)
 42. Stanley M.: Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol. Oncol.* **117**, Suppl 2, 5–10 (2010)
 43. Syrjänen S.: The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann. Oncol.* **21**, Suppl 7, 243–245 (2010)
 44. Tabrizi S.N., Unemo M., Limnios A.E., Hogan T.R., Hjelmevoll S.O., Garland S.M., Tapsall J.: Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3610–3615 (2011)
 45. Van Der Pol B., Warren T., Taylor S.N., Martens M., Jerome K.R., Mena L., Lebed J., Ginde S., Fine P., Hook E.W. 3rd.: Type-specific identification of anogenital herpes simplex virus infections by use of a commercially available nucleic acid amplification test. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3466–3471 (2012)
 46. WHO Global incidence and prevalence of curable STI 2008. 1–20 (2012)
 47. Workowski K.: In the clinic. *Chlamydia* and gonorrhoea. *Ann. Intern. Med.* **158**, ITC2-1. (2013)
 48. Zandberg D.P., Bhargava R., Badin S., Cullen K.J.: The role of human papillomavirus in nongenital cancers CA. *Cancer J. Clin.* **63**, 57–81 (2013)
 49. Zhao Y., Cao X., Tang J., Zhou L., Gao Y., Wang J., Zheng Y., Yin S., Wang Y.: A novel multiplex real-time PCR assay for the detection and quantification of HPV16/18 and HSV1/2 in cervical cancer screening. *Mol. Cell. Probes.* **26**, 66–72 (2012)
 50. Zur Hausen H.: The role of papillomaviruses in anogenital cancer. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **69**, 107–111 (1990)

Elżbieta Stefaniuk^{1,2*}, Karolina Bosacka², Waleria Hryniewicz^{1,2}

¹ Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków w Warszawie

² Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej w Warszawie

Wpłynęło we wrześniu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 2. Walidacja i weryfikacja metod i testów diagnostycznych w laboratorium mikrobiologicznym. 2.1. Weryfikacja i walidacja metody. 2.2. Weryfikacja i walidacja testów. 2.2. Walidacja metod biologicznych. 3. Procedura walidacyjna – zasady. 3.1. Plan walidacji. 3.2. Protokół walidacji. 4. Rewalidacja. 5. Procedura weryfikacji metody komercyjnej – przykład. 5.1. Cel badania. 5.2. Plan badania. 5.2.1. Zasada wykonania oznaczeń. 5.2.2. Parametry i kryteria akceptacji. 5.2.2.1. Dokładność. 5.2.2.2. Precyzja. 5.3. Wyniki i obliczenia. 5.3.1. Dokładność. 5.3.2. Precyzja w warunkach powtarzalności. 5.3.3. Precyzja w warunkach odtwarzalności. 5.3.4. Przedstawienie precyzji w formie graficznej. 5.4. Wyniki a kryteria akceptacji. 5.5. Stwierdzenie walidacyjne. 6. Podsumowanie

Validation and verification methods and diagnostic tests in the microbiology laboratory

Abstract: There are a number of measurable factors evidence of the “quality” of laboratory tests. They allow to evaluate the laboratory proficiency, staff competency and applied technologies. There is a duty of each laboratory to prove that the method meets the quality requirements and is suitable for a particular purpose and result is credible. There are many acts that require verification and validation procedures in a laboratory. The aim of this article is to present a concept of validation and verification in microbiology and give an explanation of the difference between these processes. In this study a validation and verification parameters for the methods (e.g. accuracy, precision, repeatability, reproducibility, ruggedness, LOD, LOQ, linearity) were also described and they were divided into quantitative and qualitative methods. Parameters for tests validation and verification included sensitivity, specificity PPV, NPV. In the second part of the study an example of verification process of commercial methods is presented. A various the steps of the verification tests, the rules for calculation parameters and conclusions are also shown.

1. Introduction. 2. Validation and verification methods and diagnostic tests in the laboratory. 2.1. Verification and validation of the methods. 2.2. Verification and validation of the tests. 2.2. Validation of the biological methods. 3. Validation procedure – rules. 3.1. Validation scheme. 3.2. Validation protocol. 4. Revalidation. 5. Verification procedure of the commercial method – an example. 5.1. Aim of the study. 5.2. The study plan. 5.2.1. The principle study. 5.2.2. The parameters and acceptance criteria. 5.2.2.1. Accuracy. 5.2.2.2. Precision. 5.3. Results and calculations. 5.3.1. Accuracy. 5.3.2. Precision under repeatability conditions. 5.3.3. Precision under reproducibility conditions. 5.3.4. Presentation of precision in graphical form. 5.4. Results and the acceptance criteria. 5.5. The statement validation. 6. Summary

Słowa kluczowe: walidacja, weryfikacja, parametry metody, parametry testu, kryteria akceptacji

Key words: validation, verification, method's parameters, test's parameters, acceptance criteria

1. Wprowadzenie

Istnieje wiele mierzalnych wskaźników składających się na „jakość” badania laboratoryjnego, które uważane są za cechy charakterystyczne metody i poszczególnych testów, jak również pozwalają określić biegłość laboratorium w aspekcie kompetencji personelu oraz stosowanych technologii.

Platon, grecki filozof (ok. 427–347 p.n.e), określił „jakość” jako pewien stopień doskonałości; Joseph Moses Juran (1904–2008), amerykański teoretyk zarządzania, mówił o jakości jako o stopniu, w jakim określony wyrób zaspokaja potrzeby określonego nabywcy. Dlatego też, każde przeprowadzane w laboratorium badanie należy rozważać pod kątem zdolności laboratorium do wydania dokładnego, precyzyjnego i powta-

rzalnego wyniku, czasu realizacji badania, jak również przydatności wyniku badania do dalszego postępowania, a w przypadku medycznych laboratoriów diagnostycznych, postępowania diagnostyczno-terapeutycznego. „Jakość” zatem, to zgodność z wymaganiami (Philip Bayard Crosby, 1926–2001), czyli „jakość badania laboratoryjnego” to „jakość” otrzymanego wyniku. Stosowane testy powinny cechować się wysoką precyzją, dokładnością oraz powtarzalnością wyników. Obowiązkiem każdego laboratorium jest więc podejmowanie stosownych działań utwierdzających zarówno personel laboratorium, jak i odbiorcę wyników badań laboratoryjnych, w przekonaniu, że metoda spełnia wymagania jakościowe i jest odpowiednia do określonego zastosowania (norma PN-EN ISO/IEC 17025:2005) [9]. Zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005 „laboratorium

* Autor korespondencyjny: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34, tel. 22 851 46 70; e-mail: estefaniuk@cls.edu.pl

powinno stosować właściwe metody i procedury do wszystkich badań objętych jego zakresem działalności. Dotyczy to pobierania próbek do badań, postępowania z obiektami (materiałami) poddawanych badaniom, ich przygotowania, przechowywania, transportowania oraz tam, gdzie to właściwe, oszacowania niepewności pomiaru, jak również technik statystycznych, stosowanych do analizy danych pochodzących z badania”.

Światowa Organizacja Zdrowia zdefiniowała walidację jako ustanowienie udokumentowanych dowodów dających wysoki stopień pewności, że zaplanowany proces będzie konsekwentnie przebiegać w przewidywalny i określony sposób [15]. Walidacja metod stała się standardem nie tylko w normach technicznych, ale także w przepisach prawnych, aczkolwiek żaden z tych dokumentów nie określa częstotliwości przeprowadzania walidacji metody. Autorzy dokumentów przyjęli też różne wymagania walidacyjne (definicje, metodologię i zakres parametrów walidacyjnych), w zależności od zakresu wykonywanych badań.

Celem niniejszego opracowania jest:

- przedstawienie pojęć *walidacja* i *weryfikacja* oraz wskazanie parametrów, które powinny być określone przez laboratorium mikrobiologiczne w każdym z tych procesów dla metod i testów diagnostycznych;
- przedstawienie przykładu procedury weryfikacji metody badawczej wykorzystującej nowe, komercyjne, dotychczas nie stosowane w laboratorium testy diagnostyczne.

2. Walidacja i weryfikacja metod i testów diagnostycznych w laboratorium mikrobiologicznym

Opisywane parametry walidacyjne dotyczące metod mikrobiologicznych w pierwszej kolejności odnosiły się do laboratoriów farmaceutycznych i środowiskowych. Najpełniejszy zakres parametrów walidacyjnych dla metod mikrobiologicznych przedstawiła Agencja Ochrony Środowiska w Stanach Zjednoczonych (Environmental Protection Agency, EPA) [3]. Większość zaleceń walidacyjnych dotyczyła jednak wytwórców różnego rodzaju wyrobów mających zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej. Dokument Amerykańskiego Towarzystwa Mikrobiologów *Verification and validation of procedures in the clinical microbiology* (Cumitech 31A) [1] dokonał rozdziału pomiędzy walidacją przeprowadzaną przez producenta testów a walidacją i weryfikacją wykonywaną przez użytkownika. Zakres walidacji realizowanej w laboratorium jest stosunkowo niewielki w porównaniu z zakresem walidacji przeprowadzanej przez producenta testów. Laboratorium ma obowiązek ustalenia zasad i procedur pozwa-

lających utrzymać lub poprawić niezawodność, wydajność i kliniczną użyteczność badań laboratoryjnych.

Zgodnie z zaleceniami ASM (Cumitech 31A), laboratorium powinno opracować i stosować procedury dotyczące:

- procesów zapewniania o wiarygodności wyniku, polegających na utrzymywaniu niezmienności poszczególnych kroków badawczych (metodologii), kwalifikacji i kompetencji personelu do wykonywania testów i interpretacji wyników (*walidacja*),
- metody analizy nowo wprowadzanych do stosowania w laboratorium testów komercyjnych (*weryfikacja*).

Walidacja jest więc ciągłym procesem monitorowania badania, procedury lub metody, w celu zapewnienia, że badania stale wykonywane są zgodnie z oczekiwaniami. Walidacja odpowiada zatem na pytanie: „*czy stosowany test nadal działa w naszym laboratorium?*”. Walidacja jako proces ciągły, rozpoczyna się w momencie wdrażania nowego testu, metody diagnostycznej i kończy się w momencie jego zatrzymania. Status procesu „walidowanego” oznacza, że proces ten pozostaje pod stałą kontrolą [11].

Weryfikacja natomiast, to proces jednorazowy, przeprowadzany w celu ustalenia lub potwierdzenia oczekiwanej wydajności testu, przed zastosowaniem jego w laboratorium. Weryfikacja udziela więc odpowiedzi na pytanie: „*czy test działa w naszym laboratorium?*”. **Weryfikacja oznacza sprawdzenie testu w warunkach naszego laboratorium.** Jest to więc pierwszy etap walidacji.

Zarówno normy techniczne PN-EN ISO/IEC 17025:2005, PN-EN ISO 15189:2013 [8], jak i Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r. w sprawie standardów jakości w medycznych laboratoriach mikrobiologicznych [12] wskazują tylko na konieczność potwierdzenia przydatności metod badawczych przed wprowadzeniem ich do zastosowania w laboratorium. Walidacja, zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005, jest kompromisem pomiędzy kosztami, ryzykiem i możliwościami technicznymi. Nowe badania laboratoryjne zawsze należy rozważać pod kątem dodatkowych czynników, takich jak koszty jego wprowadzenia w warunkach panujących w danym laboratorium, koszty nowego oprzyrządowania, ale również łatwości wykonania testów, kompetencji personelu, a także znaczenia klinicznego wyników uzyskanych przy ich zastosowaniu.

Korzystając ze wskazówek zawartych w przewodniku opracowanym przez organizację europejską EURACHEM „Przydatność metod analitycznych do określonych celów. Przewodnik walidacji metod w laboratorium i zagadnienia związane” [4] metodę należy walidować wtedy, gdy:

- opracowano nową metodę,

- wprowadzono zmiany w metodzie polegające na udoskonaleniu lub rozszerzeniu jej stosowania (inny zakres pomiarowy, inny materiał kliniczny),
- kontrola jakości wskazuje na zmiany zachodzące w metodzie badawczej w czasie,
- zastosowano nowe wyposażenie pomiarowo-badawcze w danej metodzie.

W laboratoriach medycznych stosuje się trzy typy metod:

- metody ilościowe – wynik wyrażony w liczbach w skali ciągłej, której górne i dolne granice są znane i pozostają w ścisłym związku z daną ilością,
- metody półilościowe – wynik opatrzony interpretacją, pojęcie prognostyczne,
- metody jakościowe – wynik nie niesie informacji na temat wartości liczbowej parametru, lecz tylko na temat jego obecności lub braku (dodatni/ujemny). Do tego typu metod można zaliczyć wszystkie analizy, których wynik uzyskuje się poprzez wizualny odczyt reakcji, porównując z próbką kontrolną dodatnią, ujemną lub daną próbką. W pewnym sensie, odczyt analizy wykonanej metodą jakościową jest odczytem subiektywnym, stąd w metodach tych bardzo ważną rolę odgrywa czynnik ludzki.

Mało elementów uchwytanych, mierzalnych w metodach jakościowych sprawia, że ważną, wręcz fundamentalną rolę odgrywa bibliografia, dokumentacja literaturowa. Różnice poszczególnych typów metod powodują, że inaczej przeprowadza się walidację metody ilościowej, inaczej – metody jakościowej. W protokole z walidacji powinny być naniesione wszystkie dane wejściowe metody, które mogą mieć wpływ na wynik analiz.

Zgodnie z zaleceniami przewodnika EURACHEM, w procesach weryfikacji i walidacji ocenie podlegają różne parametry, w zależności czy dotyczą charakterystyki metod, czy też testów stosowanych w laboratorium mikrobiologicznym.

2.1. Weryfikacja i walidacja metody

Poniżej przedstawiono parametry oceniane w procesach weryfikacji i walidacji metody badawczej [1].

- **Dokładność** (*accuracy*) – oznacza „bliskość, zgodność” wartości poszczególnych parametrów do wartości uzyskanych metodami referencyjnymi; powinna być sprawdzana odpowiednimi materiałami kontrolnymi, porównaniami międzylaboratoryjnymi, jeśli są dostępne, za pomocą metody referencyjnej. W metodach ilościowych pojawia się także pojęcie **poprawności**, która w większości przypadków będzie tożsama z dokładnością. Różnica polega na tym, że poprawność określa stopień zgodności między wartością średnią otrzymaną z dużego zbioru pomiarów a wartością odniesienia. Miarą poprawności jest całko-

wity błąd systematyczny, czyli różnica pomiędzy wynikiem badania a wartością odniesienia.

$$\text{dokładność} = \frac{\text{liczba wyników prawidłowych}}{\text{liczba wszystkich wyników}} \times 100\% \quad (\text{A1})$$

- **Precyzja** (*precision*) – zgodność wyników serii pomiarów w danej próbce przy użyciu danej metody. Miernikiem precyzji dla metod ilościowych jest odchylenie standardowe (S) lub współczynnik zmienności wyrażany w procentach dla wyników uzyskanych w serii pomiarów. Miarą precyzji jest powtarzalność i odtwarzalność. Precyzja (w metodach ilościowych) to synonim powtarzalności/odtwarzalności (w metodach jakościowych) przy zastosowaniu identycznych procedur.

$$\begin{array}{l} \text{precyzja w warunkach} \\ \text{powtarzalności/odtwarzalności} \\ \text{wyrażona jako} \\ \text{odchylenie standardowe (S)} \\ \text{(metody ilościowe)} \end{array} \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{A2})$$

- **Powtarzalność** (*repeatability*) – zgodność wyników pomiarów uzyskanych w danej próbce w tych samych warunkach pomiarowych, tj. w tym samym laboratorium, tą samą metodą, przez tę samą osobę, w krótkim czasie (seria jednoczesna).

$$\text{powtarzalność} = \frac{\text{liczba „powtórzonych” wyników zgodnych}}{\text{całkowita liczba wyników}} \times 100\% \quad (\text{A3})$$

- **Odtwarzalność** (*reproducibility*) – precyzja w warunkach odtwarzalności, tj. w różnych laboratoriach, tą samą metodą, przez różne osoby, w długim okresie czasu (seria niejednoczesna).

$$\text{odtwarzalność} = \frac{\text{liczba „odtworzonych” wyników zgodnych}}{\text{całkowita liczba wyników}} \times 100\% \quad (\text{A4})$$

- **Odporność metody** (*ruggedness*) – wpływ zmiany warunków wykonywania pomiarów na stabilność wyników. Umożliwia wskazanie krytycznych etapów badanej metody oraz etapów, w których dopuszczalne są pewne zmiany pozostające bez wpływu na parametry analityczne metody (np. wpływ temperatury i czasu inkubacji na wyniki, wpływ sposobu postępowania z próbką i warunków jej przechowywania, wpływ doświadczenia personelu, zwłaszcza w przypadku metod jakościowych oraz oznaczeń manualnych).

- **Granica wykrywalności** (*limit of detection* – LOD) – najmniejsze stężenie parametru w próbce, które można wykryć daną metodą.

- **Granica oznaczalności (granica oznaczenia ilościowego)** (*limit of quantification* – LOQ) – najmniejsze stężenie parametru, jakie można oznaczyć daną metodą z określoną dokładnością i precyzją.

- **Liniowość metody** (*linearity*) – zakres liniowy krzywej kalibracji, w którym sygnał jest liniowo zależny od stężeń wzorców.

- Na uzyskane wyniki pomiarów mają wpływ:
- niedokładność narzędzi pomiarowych,
 - nieścisłość w wykonaniu procedury pomiarowej,
 - niemożność dokładnego określenia, scharakteryzowania mierzonego obiektu,
 - wpływ czynników losowych na przebieg pomiaru.

2.2. Weryfikacja i walidacja testów

Poniżej przedstawiono parametry oceniane w procesach weryfikacji i walidacji testów [1].

• **Czułość** (*sensitivity*)

$$\text{czułość} = \frac{\text{liczba prawdziwie-dodatnich wyników}}{\text{liczba prawdziwie-dodatnich wyników} + \text{liczba fałszywie-ujemnych wyników}} \times 100\% \tag{A5}$$

• **Specyficzność** (*specificity*)

$$\text{specyficzność} = \frac{\text{liczba prawdziwie-ujemnych wyników}}{\text{liczba prawdziwie-ujemnych wyników} + \text{liczba fałszywie-dodatnich wyników}} \times 100\% \tag{A6}$$

• **Dodatnia wartość predykcyjna** (*positive predictive value, PPV*)

$$\text{PPV} = \frac{\text{liczba prawdziwie-dodatnich wyników}}{\text{liczba prawdziwie-dodatnich wyników} + \text{liczba fałszywie-dodatnich wyników}} \times 100\% \tag{A7}$$

• **Ujemna wartość predykcyjna** (*negative predictive value, NPV*)

$$\text{NPV} = \frac{\text{liczba prawdziwie-ujemnych wyników}}{\text{liczba prawdziwie-ujemnych wyników} + \text{liczba fałszywie-ujemnych wyników}} \times 100\% \tag{A8}$$

Badanie precyzji powtarzalności, precyzji odtwarzalności oraz poprawności są wystarczające dla potwierdzenia przeprowadzenia procesu walidacji ilościowych komercyjnych metod badawczych stosowanych w laboratoriach medycznych. W normie PN-EN ISO/IEC 17025:2005 wskazano techniki, których stosowanie zalecane jest podczas walidacji:

- sprawdzanie bieżące z wykorzystaniem certyfikowanych wzorców lub innych materiałów odniesienia,
- porównanie otrzymanych wyników z wynikami uzyskanymi innymi metodami, dotychczas stosowanymi w laboratorium (*weryfikacja*),
- analiza wyników uzyskanych w porównaniach międzylaboratoryjnych lub badaniach biegłości,
- okresowa ocena czynników wpływających na wynik,
- ocena niepewności wyników oparta na teoretycznych podstawach metody i praktycznym doświadczeniu personelu laboratorium.

Jeśli laboratorium samodzielnie opracowuje i wdraża

metodę badawczą (tzw. „*home brew test*”), Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 28 grudnia 2009 r. w sprawie zmiany rozporządzenia o standardach jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych, jak i normy techniczne, wymagają od laboratorium przeprowadzenia pełnej walidacji metody.

2.3. Walidacja metod biologicznych

Walidacja klasycznych metod mikrobiologicznych, które przeważnie są metodami jakościowymi, jest bardziej skomplikowanym procesem niż walidacja metod chemicznych, gdyż dotyczy żywych organizmów, które nierównomiernie rozkładają się w badanej próbce, a także mogą wykazywać pewne różnice w zachowaniu. Mamy więc do czynienia z procesem dynamicznym, a nie statycznym [7]. W Tabeli I wskazano parametry walidacji metod biologicznych w zależności od rodzaju metody [10, 13, 14].

W Tabeli II przedstawiono parametry, które laboratorium powinno określić w ramach weryfikacji komercyjnych metod biologicznych (opisanych i opracowanych przez producenta) [1, 6].

Tabela I
Parametry walidacji metod biologicznych

Walidowany parametr	Metoda ilościowa	Metoda jakościowa/półilościowa
Dokładność	+	–
Precyzja	+	–
Specyficzność	+	+
Granica wykrywalności	+	+
Granica oznaczalności	+	–
Liniowość	+	–
Zakres	+	–
Powtarzalność	+	+
Odtwarzalność	+	+
Równocенność	+	+

Tabela II
Parametry służące do weryfikacji komercyjnych metod biologicznych zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 28 grudnia 2009 r.

Parametry weryfikacyjne dla metod komercyjnych	Metoda ilościowa	Metoda jakościowa /półilościowa
Dokładność	+	
Precyzja	+	
Powtarzalność		+
Odtwarzalność		+
Równocенność*	+	+

* parametr powinien być oznaczany dodatkowo dla metod komercyjnych modyfikowanych w laboratorium

Do oceny przydatności testów służą parametry takie jak czułość, swoistość, dodatnia i ujemna wartość predykcyjna. Warto jednak podkreślić, że ocena nowych testów diagnostycznych będzie wykonywana zawsze w oparciu o wyniki otrzymane metodą referencyjną.

3. Procedura walidacji – zasady

3.1. Plan walidacji

Przed przystąpieniem do walidacji, laboratorium powinno opracować plan walidacji, w którym należy:

- uwzględnić rodzaj metody: jakościowa, półilościowa, ilościowa;
- określić rodzaj wyposażenia niezbędnego do przeprowadzenia badania;
- ustalić kliniczne materiały biologiczne oraz gatunki drobnoustrojów, jakie będą użyte w badaniu;
- określić wartości referencyjne ustalone na podstawie metod odniesienia;
- określić kryteria akceptacji wyników;
- wskazać personel odpowiedzialny za przeprowadzenie oznaczeń oraz interpretację wyników;
- określić czas wykonywania oznaczeń.

3.2. Protokół walidacji

Po zakończeniu badań walidacyjnych należy skompletować całą dokumentację źródłową oraz wyniki przeprowadzonych oznaczeń, zarówno wydruki z zastosowanych systemów analitycznych, jak i pochodzące z odczytów wizualnych. Laboratorium samo decyduje o sposobie zapisów wyników walidacji, czy to w formie opisowej, czy w postaci tabeli. Niemniej, jako minimum informacji w protokole walidacyjnym, należy zawrzeć:

- identyfikację metody badawczej, dla metod opracowanych w laboratorium, odniesienie literaturowe,
- cel badania,
- obiekty wykorzystane do badania: materiały biologiczne od pacjenta, jak i szczepy drobnoustrojów wzorcowych i/lub odniesienia, wraz ze stosowną ich charakterystyką,
- badane cechy,
- zastosowane wyposażenie pomiarowo-badawcze (nazwa, producent),
- zastosowane odczynniki, testy (nazwa, producent, numer serii, data ważności),
- parametry walidacyjne – wartości cech charakterystycznych metody uzyskane w procesie walidacji i ich ocena pod kątem spełnienia przyjętych kryteriów akceptacji,
- dane osób wykonujących badania, podpisy,

- dane osoby analizującej i interpretującej wyniki oznaczeń, podpis,
- stwierdzenie walidacyjne – stwierdzenie o przydatności metody do zamierzonego zastosowania (zgodnie z celem badania),
- dane i podpis osoby upoważnionej do zatwierdzenia walidacji metody.

4. Rewalidacja

Ciągłe monitorowanie metody badawczej stanowi integralną część programu laboratoryjnej kontroli jakości. Zaleca się także, aby po wprowadzeniu istotnej zmiany w metodzie badawczej przeprowadzić ponowną walidację (rewalidacja), przynajmniej w zakresie objętym zmianą [1]. Zakres ponownej walidacji ustala laboratorium. Rewalidację wykonuje się w następujących sytuacjach:

- zmiany wyposażenia pomiarowo-badawczego lub zmianie jego lokalizacji,
- zmiany producenta odczynników i testów stosowanych w metodzie,
- zmiany warunków lokalowo-środowiskowych, w jakich wykonywane są badania,
- zmiany personelu wykonującego badania, na personel o mniejszym doświadczeniu,
- „nowych” zagrożeń ze strony epidemiologii zakażeń, np. pojawienie się nowych patogenów o nie spotykanych dotąd w laboratorium cechach fenotypowych, genotypowych.

5. Procedura weryfikacji metody komercyjnej

– przykład

Metoda: Oznaczanie wartości najmniejszych stężeń hamujących MIC (mg/L) z użyciem pasków z gradientem stężeń.

Poniżej przedstawiono przykład procedury weryfikacji metody badawczej, która w laboratorium jest już stosowana od dłuższego czasu, ale w ramach tej metody laboratorium zamierza wprowadzić nowe testy diagnostyczne. W opisie procedury pominięto etap „inventaryzacji” (tj. nazw, producentów, numerów katalogowych, spisu numerów serii, dat ważności, itp.) stosowanych testów, odczynników i wyposażenia. Pominięto również szczegółowy opis metody badawczej, tj. oznaczania lekowrażliwości metodą pasków z gradientem stężeń. W procesie planowania badania uwzględniono aspekt ekonomiczny, co znalazło odzwierciedlenie m.in. w liczbie wykonanych oznaczeń i doborze materiałów odniesienia.

Przedstawione poniżej wyniki należy traktować wyłącznie jako materiał metodyczny i nie mogą być one wykorzystywane do celów komercyjnych.

5.1. Cel badania

Celem badania była weryfikacja metody oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów – oznaczania wartości najmniejszych stężeń hamujących antybiotyku (*minimal inhibitory concentration*, MIC [mg/L]) przy użyciu nowych testów – bibułowych pasków z gradientem stężeń antybiotyków/chemioterapeutyków dotychczas nie stosowanych w laboratorium, pod kątem oceny ich przydatności do zastosowania w rutynowej pracy laboratorium.

5.2. Plan badania

Ze względu na koszty badania weryfikacyjnego, oznaczenie wykonano tylko na szczepach referencyjnych – szczepach wzorcowych z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (*American Type Culture Collection*, ATCC), bardzo dobrze sklasyfikowanych.

5.2.1. Zasada wykonania oznaczeń

Wyjaśnienie: Metoda oznaczania najmniejszego stężenia hamującego antybiotyku – MIC (zalicza się do metod ilościowych, gdyż wynikiem badania jest wartość liczbową podaną w mg/L, określającą stężenie antybiotyku, przy którym zahamowany zostaje wzrost drobnoustroju). Metoda ta jest rutynowo wykorzystywana w laboratoriach mikrobiologicznych i podlega kontroli jakości (*quality control*, QC) zgodnie z wytycznymi EUCAST [5]. Dlatego też, do weryfikacji metody oznaczania MIC „nowymi” paskami gradientowymi można wykorzystać wyniki kilkakrotnie przeprowadzonej kontroli jakości.

1. Badanie zostało wykonane przez dwóch mikrobiologów w trzech powtórzeniach (łącznie 6 oznaczeń). Wyjaśnienie: Taka liczba powtórzeń i odtworzeń pozwala obliczyć precyzję w warunkach powtarzalności i odtwarzalności.
2. Do weryfikacji pojedynczego testu (jeden typ paska z gradientem stężeń, np. pasek nasączony gradientem stężeń cefepimu) wykorzystano jeden z trzech szczepów wzorcowych zastosowanych w badaniu. Szczepy wzorcowe wykorzystane do oceny „nowych” pasków z gradientem stężeń oraz wykaz testów – pasków z gradientem stężeń poszczególnych antybiotyków przedstawiono w Tabeli III.
3. Aby ograniczyć liczbę zmiennych mających wpływ na wynik, próby powtórzone były wykonywane z tej samej zawiesiny bakteryjnej szczepu wzorcowego.
4. Zawiesinę badanych izolatów o gęstości 0,5 McFarlanda posiewano na podłoże Mueller-Hinton Agar, a następnie nakładano odpowiednie paski z gradientem stężeń (zgodnie z rekomendacjami EUCAST). Inkubację prowadzono w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 godzin w temperaturze $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tabela III

Zestawienie wykorzystanych w badaniu szczepów wzorcowych z kolekcji ATCC vs. badany antybiotyk (pasek z gradientem stężeń)

Paski z gradientem stężeń antybiotyku	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
Cefepim		+	
Cefotaksym	+		
Ceftazydym		+	
Ciprofloksacyna	+		
Kolistyna		+	
Daptomycyna			+
Gentamicyna	+		
Imipenem	+		
Linezolid			+
Meropenem	+		
Piperacylina/tazobaktam		+	
Teikoplanina			+
Tigecyklina	+		
Wankomycyna			+

5. Wartości MIC odczytano zgodnie z zaleceniami producenta testów i rekomendacjami EUCAST. Uzyskane wyniki wykorzystano do oceny parametrów charakteryzujących metodę.

5.2.2. Parametry i kryteria akceptacji

5.2.2.1. Dokładność

Otrzymany wynik oznaczenia lekowrażliwości (wartość MIC) należy porównać z wartością odniesienia (wartością umownie rzeczywistą). Badanie przeprowadza się wykorzystując szczepy wzorcowe, służące do rutynowej kontroli jakości, dla których wartości MIC (mg/L) poszczególnych antybiotyków są ściśle określone. Wynik dokładny to taki, który mieści się w przedziale (*range*) wartości prawidłowych dla danego szczepu i antybiotyku. Dokładność można obliczyć korzystając ze wzoru:

$$\text{dokładność} = \frac{\text{liczba wyników zgodnych z wartościami QC dla każdego szczepu i każdego antybiotyku}}{\text{liczba wszystkich oznaczeń}} \times 100\%$$

(A9)

(wzór odpowiada wzorowi A1 z rozdz. 2.1.)

Kryterium akceptacji: dla metod oznaczania lekowrażliwości akceptowalnym kryterium jest uzyskanie > 90% wyników zgodnych z metodą odniesienia [2].

5.2.2.2. Precyzja

W badaniach ilościowych precyzję oznacza się w warunkach powtarzalności i odtwarzalności. Przy projektowaniu badań należy uwzględnić odpowiednią liczbę oznaczeń:

Tabela IV
Wyniki oznaczeń – weryfikacja metody oznaczania wartości MIC (mg/L) z wykorzystaniem „nowych” pasków gradientowych

Paski z gradientem stężeń antybiotyku	Szczep wzorcowy*	Prawidłowe wartości QC MIC (mg/L)	1. mikrobiolog oznaczenie / MIC (mg/L)			2. mikrobiolog oznaczenie / MIC (mg/L)		
			I	II	III	I	II	III
Cefepim	1	0,5–4	2	1,5	2	1,5	1,5	1,5
Cefotaksym	2	0,03–0,125	0,047	0,064	0,047	0,047	0,047	0,047
Ceftazydym	1	1–4	1,5	1,5	1,5	1,5	1	1
Ciprofloksacyna	2	0,004–0,016	0,016	0,016	0,016	0,023	0,016	0,016
Kolistyna	1	0,5–4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Daptomycyna	3	0,125–1	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5
Gentamicyna	2	0,25–1	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75
Imipenem	2	0,06–0,25	0,19	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Linezolid	3	1–4	2	2	1,5	2	1,5	2
Meropenem	2	0,008–0,06	0,023	0,023	0,016	0,016	0,016	0,016
Piperacylina/tazobaktam	1	1–8	4	4	4	4	6	4
Teikoplanina	3	0,25–1	0,75	1	0,75	1	0,75	0,75
Tigecyklina	2	0,03–0,25	0,125	0,125	0,094	0,125	0,094	0,094
Wankomycyna	3	0,5–2	1	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75

* szczepy wzorcowe: nr 1 – *P. aeruginosa* ATCC 27853; nr 2 – *E. coli* ATCC 25922; nr 3 – *S. aureus* ATCC 29213.

- w celu obliczenia precyzji w warunkach powtarzalności oznaczenie powinno być powtórzone minimum trzykrotnie przez jedną osobę;
- natomiast, aby ocenić precyzję w warunkach odtwarzalności, wskazane jest wykonanie badania przez minimum dwie niezależne osoby.

Precyzję można wyrazić w postaci współczynnika zmienności zgodnie ze wzorem:

$$\text{współczynnik zmienności} = \frac{\text{odchylenie standardowe}}{\text{wartość średnia}} \times 100\%$$

(A10)

(patrz: precyzja, rozdz. 2.1.)

Kryterium akceptacji: Dla metod mikrobiologicznych współczynnik zmienności jest akceptowalny w zakresie 15–30% [6]. Im niższa wartość współczynnika zmienności, tym precyzja większa.

5.3. Wyniki i obliczenia

Wyniki oznaczeń zebrano w tabeli IV.

5.3.1. Dokładność

Tylko jeden wynik – wartość MIC (mg/L) ciprofloksacyny dla szczepu *E. coli* ATCC 25922 odczytany przez mikrobiologa nr 2. (oznaczenie nr I) nie mieścił się w zakresie prawidłowych wartości referencyjnych QC (patrz: tabele EUCAST). Dokładność wszystkich oznaczeń została obliczona zgodnie z wzorem (A9) i zebrana w Tabeli V.

5.3.2. Precyzja w warunkach powtarzalności

Do oceny precyzji w warunkach powtarzalności zostały wykorzystane trzykrotnie powtórzone wyniki otrzymane przez dwóch niezależnych mikrobiologów.

Tabela V
Dokładność metody określania wartości MIC (mg/L) wybranymi paskami z gradientem stężeń

Antybiotyki w paskach gradientowych	Dokładność [%]
Cefepim	100,00
Cefotaksym	100,00
Ceftazydym	100,00
Ciprofloksacyna	83,33
Kolistyna	100,00
Daptomycyna	100,00
Gentamicyna	100,00
Imipenem	100,00
Linezolid	100,00
Meropenem	100,00
Piperacylina/tazobaktam	100,00
Teikoplanina	100,00
Tigecyklina	100,00
Wankomycyna	100,00
Wartość średnia z dokładności	98,8

Precyzję oznaczeń obliczono, zgodnie ze wzorami (A2) i (A10), osobno dla każdego z mikrobiologów (powtarzalność). Wyniki przedstawiono w Tabeli VI.

5.3.3. Precyzja w warunkach odtwarzalności

W celu wyznaczenia precyzji w warunkach odtwarzalności do obliczeń zostały zakwalifikowane wszystkie wyniki otrzymane w badaniu (razem mikrobiolog 1. i 2. – odtwarzalność). Podobnie, jak powyżej, precyzję wyrażono w postaci wartości średniej współczynnika zmienności (patrz: Tabela VII).

Tabela VI
Precyzja w warunkach powtarzalności

Paseki z gradientem stężeń antybiotyku	1. mikrobiolog			2. mikrobiolog		
	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Cefepim	1,83	0,29	15,75	1,50	0,00	0,00
Cefotaksym	0,05	0,01	18,64	0,05	0,00	0,00
Ceftazydym	1,50	0,00	0,00	1,17	0,29	24,74
Ciprofloksacyna	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	22,04
Kolistyna	1,50	0,00	0,00	1,50	0,00	0,00
Daptomycyna	0,67	0,14	21,65	0,58	0,14	24,74
Gentamicyna	0,75	0,00	0,00	0,67	0,14	21,65
Imipenem	0,23	0,03	15,06	0,25	0,00	0,00
Linezolid	1,83	0,29	15,75	1,83	0,29	15,75
Meropenem	0,02	0,00	19,56	0,02	0,00	0,00
Piperacylina/tazobaktam	4,00	0,00	0,00	4,67	1,15	24,74
Teikoplanina	0,83	0,14	17,32	0,83	0,14	17,32
Tigecyklina	0,11	0,02	15,61	0,10	0,02	17,15
Wankomycyna	0,83	0,14	17,32	0,75	0,00	0,00
Współczynnik zmienności [%] – wartość średnia (warunki powtarzalności)	11,19			12,01		

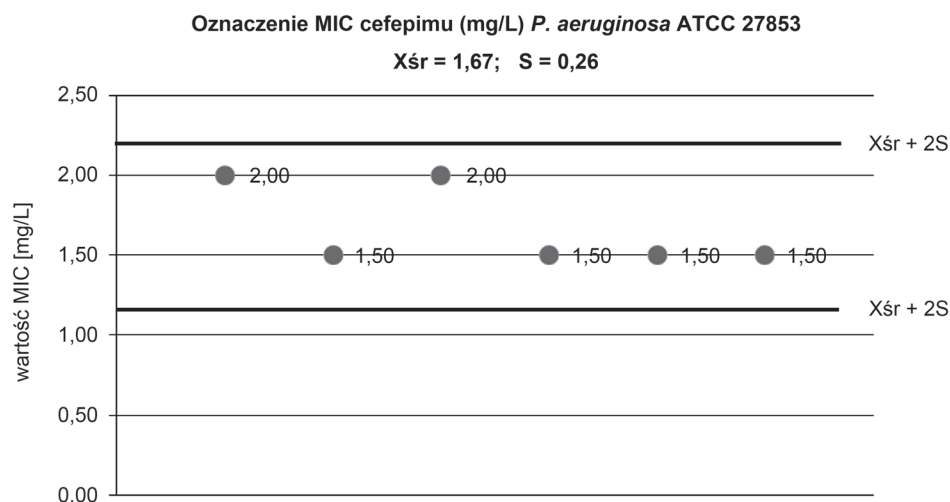
Tabela VII
Precyzja z warunkach odtwarzalności

Paski z gradientem stężeń antybiotyku	Zebrane wyniki (mikrobiolog 1. i 2.)		
	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Cefepim	1,67	0,26	15,49
Cefotaksym	0,05	0,01	13,93
Ceftazydym	1,33	0,26	19,36
Ciprofloksacyna	0,02	0,00	16,65
Kolistyna	1,50	0,00	0,00
Daptomycyna	0,63	0,14	21,91
Gentamicyna	0,71	0,10	14,41
Imipenem	0,24	0,02	10,21
Linezolid	1,83	0,26	14,08
Meropenem	0,02	0,00	19,72
Piperacylina/tazobaktam	4,33	0,82	18,84
Teikoplanina	0,83	0,13	15,49
Tigecyklina	0,11	0,02	15,51
Wankomycyna	0,79	0,10	12,89
Współczynnik zmienności [%] – wartość średnia (warunki odtwarzalności)	14,89		

5.3.4. Przedstawienie precyzji w formie graficznej

Dodatkowo, precyzję, dla każdego z antybiotyków osobno, przedstawiono także w formie graficznej. Rys. 1. przedstawia wyniki oznaczania wartości MIC (mg/L) cefepimu dla szczepu *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Wyjaśnienie: Aby wyniki oznaczeń uznać za precyzyjne, 95% z nich (n=6/6) powinno mieścić się w zakresie $\bar{X} \pm 2S$ ($\bar{X}$ – wartość średnia; S – odchylenie standardowe); np. oznaczanie wartości MIC (mg/L) cefepimu: $\bar{X} = 1,67$; $S = 0,26$



Rys. 1. Graficzne przedstawienie precyzji oznaczenia MIC cefepimu (mg/L); wartość średnia $\bar{X}sr = 1,67$; odchylenie standardowe $S = 0,26$

Zakres, w którym powinno się mieścić 95% wyników (w przedstawianym przykładzie wszystkie wyniki), zgodnie ze wzorem $\bar{X}sr \pm 2S$ wynosi $1,67 \pm (2 \times 0,26)$. Przedział, w którym powinny się znaleźć otrzymane wartości wynosi więc od 1,15 do 2,19.

Wszystkie otrzymane wyniki mieszczą się w wyznaczonym zakresie, co pozwoliło uznać metodę (dla tego antybiotyku) za precyzyjną (precyzja w warunkach odtwarzalności, wyniki obu mikrobiologów łącznie).

5.4. Wyniki a kryteria akceptacji

1. Zastosowana metoda oceny lekowrażliwości z wykorzystaniem „nowych”, bibułowych pasków z gradientem stężeń (określanie wartości MIC w mg/L) dotychczas nie stosowanych w laboratorium, charakteryzuje się wysoką dokładnością (za wyjątkiem ciprofloksacyny) oraz precyzją, zarówno w warunkach powtarzalności, jak i odtwarzalności.
2. Najniższą dokładność (83,3%) otrzymano dla oznaczeń wartości MIC ciprofloksacyny dla szczepu wzorcowego *E. coli* ATCC 25922. Jeden z sześciu pomiarów nie mieścił się w zakresie referencyjnym QC dla tego szczepu. Dokładność dla tego antybiotyku nie spełniła więc kryteriów akceptacji, dlatego też przed dopuszczeniem tego testu (pasek z ciprofloksacyną) do rutynowego stosowania w laboratorium należy wykonać serię dodatkowych oznaczeń z zastosowaniem np. innej serii pasków tego producenta, czy też podłoży antybiogramowych.
3. Badanie zostało wykonane niezależnie przez dwóch mikrobiologów. Precyzja, wyrażona jako współczynnik zmienności, obliczona dla każdej z tych osób wynosiła poniżej 15% (precyzja w warunkach powtarzalności).

Niższy współczynnik zmienności, czyli wyższą precyzję, odnotowano w przypadku wyników mikrobiologa 1., co może świadczyć o większym doświadczeniu zarówno w kwestii technicznej wykonania badania, jak i odczycie wyników. Niemniej, różnica między mikrobiologiem 1. i 2. jest niewielka i nie jest istotna statystycznie.

4. Precyzja w warunkach odtwarzalności mieści się w akceptowalnym zakresie dla wszystkich antybiotyków (wartość średnia = 14,89). Najniższą precyzją charakteryzuje się oznaczenie wartości MIC daptomycyny, a najwyższą – MIC kolistyny.
5. Współczynnik zmienności obliczony w warunkach odtwarzalności może być wyznacznikiem komfortu pracy z daną metodą. Im mniejsze różnice pomiędzy osobami wykonującymi badanie, tym niższa jest wartość współczynnika zmienności, co świadczy o niskim stopniu trudności wykonania badania i bezproblemowej interpretacji wyników. Dlatego też, współczynniki zmienności dla poszczególnych antybiotyków mogą się od siebie różnić. Ma to związek nie tylko z jakością testu, ale także z budową antybiotyku (wielkość cząsteczki), zasadą działania na drobnoustroje (leki bakteriobójcze i bakteriostatyczne), specyfiką badanego szczepu oraz z jakością i składem podłoża.

W Tabeli VIII przedstawiono zgodność określonych parametrów metody z przyjętymi w niniejszym badaniu kryteriami akceptacji.

5.5. Stwierdzenie walidacyjne (dotyczy przeprowadzonej weryfikacji)

Na podstawie przeprowadzonej analizy można wnioskować, że otrzymane w badaniu wartości parametrów charakterystycznych (dokładność i precyzja)

Tabela VIII
Analiza spełnienia kryteriów akceptacji przez parametry wyznaczone dla badanej metody

Parametry metody oznaczania wartości MIC (mg/L) przy użyciu pasków bibułowych z gradientem stężeń			
Badany parametr	Wartość	Kryteria akceptacji	Spełnienie kryteriów
Dokładność	100% za wyjątkiem ciprofloksacyny	≥ 90%	Tak za wyjątkiem ciprofloksacyny
Precyzja w warunkach powtarzalności	11,60%*	≤ 30%	Tak
Precyzja w warunkach odtwarzalności	14,89%	≤ 30%	Tak

* wartość średnia wyników mikrobiologa 1. i 2.

dla metody oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów z wykorzystaniem „nowych” pasków bibułowych z gradientem stężeń, spełniają przyjęte kryteria akceptacji za wyjątkiem paska z ciprofloksacyną.

Oznaczanie wartości MIC (mg/L) ciprofloksacyny dla szczepu *E. coli* ATCC 25922 cechuje się niedostateczną dokładnością. Sugeruje się, przed „dopuszczeniem” tego testu do stosowania, wykonanie dodatkowych oznaczeń.

Oceniana metoda (za wyjątkiem paska z ciprofloksacyną) może być stosowana w laboratorium w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej do oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów.

6. Podsumowanie

Stosowanie dobrze opisanych i sprawdzonych metod nie daje automatycznie gwarancji uzyskania rzetelnych wyników. Tą samą metodą można uzyskać różne wyniki w zależności od kwalifikacji personelu czy stosowanego wyposażenia pomiarowo-badawczego. Dlatego też, laboratorium powinno kontrolować jakość wykonywanych badań, aby móc udowodnić, że jest w stanie spełnić kryteria akceptacji opisane w stosowanych przez siebie metodach.

Walidacja i weryfikacja badań mikrobiologicznych przysparza trudności, ponieważ dotyczy żywych drobnoustrojów, które oprócz nierównomiernego występowania w badanej próbce, mogą także wykazywać pewne różnice w zachowaniu. Dlatego, podczas projektowania badań walidacyjnych czy toku weryfikacji, należy wziąć pod uwagę także naturę drobnoustrojów używanych do testów walidacyjnych, sposób przygotowania zawiesiny drobnoustrojów testowych, specyficzne warunki testu, a nawet warunki izolacji drobnoustrojów.

Piśmiennictwo

1. Clark R.B., Lewinski M.A., Loeffelholz M.J., Tibbetts R.J.: Cumitech 31A (w) Verification and validation of procedures in the clinical microbiology, red. D.L. Sewell, ASM Press, Washington (2009)
2. CLSI. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline. Third ed. CLSI document M23-A3. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2008)
3. EPA: Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency. Microbiological Methods of Analysis (2009)
4. EURACHEM. Przydatność metod analitycznych do określonych celów. Przewodnik walidacji metod w laboratorium i zagadnienia związane. *POLLAB, Biul. Inf.* **2**, 30 (2000)
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST. Version 5.0 www.eucast.org; www.korl.edu.pl (2015)
6. Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, Supp. TR **33**, **54**, 3 (2000)
7. Pasek W.: Walidacja metod mikrobiologicznych. *Pharmaceutica*, **8**, 4–6 (1999)
8. PN-EN ISO 15189:2013. Laboratoria medyczne – wymagania dotyczące jakości i kompetencji.
9. PN-EN ISO/IEC 17025:2005. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
10. Przewodnik walidacji metod oznaczania biologicznego. Raport Komisji SFSTP. *Pharmaceutica*, **3**, 5–8 (2004)
11. Roman S.: Dlaczego i jak walidować. *Pharmaceutica*, **3**, 58 (1998)
12. Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych 21 stycznia 2009 z późniejszymi zmianami (Dz.U.2009.22.128)
13. Tyski S.: Kontrolne badania mikrobiologiczne stosowane w farmacji, nowe metody i ich walidacja. *Mikrobiologia Medycyna*, **2**, 16–24 (2001)
14. Tyski S.: Nowe, szybkie metody mikrobiologiczne w badaniach jakości leków. *Biuletyn Instytutu Leków*, **45**, 636–652 (2001)
15. World Health Organization; A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation, 3 (2007)

SPIS TREŚCI

Prof. zw. dr hab. Zdzisław Larski (1919–2015)	305
I. Korona-Głowniak, A. Malm – <i>Streptococcus pneumoniae</i> – kolonizacja a rozwój choroby pneumokokowej	309
J. Nowicka, M. Bartoszewicz – Zakażenia w ortopedii związane ze stosowaniem biomateriałów	320
A. Gałązka, K. Gawryjołek – Glomalina – glicoproteina glebowa produkowana przez grzyby mykoryzy arbuskularnej	331
R. Ogórek, A. Lejman – Badania speleomikologiczne w wybranych obiektach podziemnego kompleksu Riese (Góry Sowie, Dolny Śląsk, Polska)	344
W. Kmiecik, E.M. Szewczyk – Cytolizyny – czynniki zjadliwości <i>Staphylococcus intermedius</i> i <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	354
A.M. Kot, S. Błażej, A. Kurcz, I. Gientka – Drożdże jako potencjalne źródło tłuszczu mikrobiologicznego	364
W. Kurzątkowski, A. Gębska-Kuczerowska – Ultrastrukturalna organizacja komórek grzybnia <i>Acremonium chrysogenum</i> podczas produkcji cefalosporyny C na skalę przemysłową	374
E. Krzyżewska, M. Książczyk, A. Kędziora, B. Futoma-Kołocho, G. Bugla-Płoskońska – Modyfikacje struktur komórkowych mikroorganizmów wywołane działaniem biocydów	380
A. Namysłowska, A.E. Laudy, S. Tyski – Mechanizmy oporności <i>Acinetobacter baumannii</i> na związki przeciwbakteryjne	392

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

B. Młynarczyk-Bonikowska, E. Skulska, M. Malejczyk, S. Majewski – Metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych w diagnostyce wybranych chorób przenoszonych drogą płciową	407
E. Stefaniuk, K. Bosacka, W. Hryniewicz – Walidacja i weryfikacja metod i testów diagnostycznych w laboratorium mikrobiologicznym	415

CONTENTS

Prof. zw. dr hab. Zdzisław Larski (1919–2015)	305
I. Korona-Głowniak, A. Malm – <i>Streptococcus pneumoniae</i> – colonization and pneumococcal disease	309
J. Nowicka, M. Bartoszewicz – Orthopedic surgery infections related to the use of biomaterials	320
A. Gałązka, K. Gawryjołek – Glomalinalin – soil glicoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungus	331
R. Ogórek, A. Lejman – Speleomycological research in the selected objects of underground Riese complex (Sowie Mountains, Lower Silesia, Poland)	344
W. Kmiecik, E.M. Szewczyk – Cytolysins – virulence factors of <i>Staphylococcus intermedius</i> and <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	354
A.M. Kot, S. Błażej, A. Kurcz, I. Gientka – Yeast as a potential source of microbial fat ..	364
W. Kurzątkowski, A. Gębska-Kuczerowska – Compartmentalization in cephalosporin C biosynthesis by industrial strains <i>Acremonium chrysogenum</i>	374
E. Krzyżewska, M. Książczyk, A. Kędziora, B. Futoma-Kołocho, G. Bugla-Płoskońska – Modifications of cell structure of microorganisms induced by biocides	380
A. Namysłowska, A.E. Laudy, S. Tyski – <i>Acinetobacter baumannii</i> : mechanisms of resistance to antibacterial agents	392

METHODS AND STANDARDS

B. Młynarczyk-Bonikowska, E. Skulska, M. Malejczyk, S. Majewski – Nucleic acid amplification methods in laboratory diagnostics of selected sexually transmitted diseases	407
E. Stefaniuk, K. Bosacka, W. Hryniewicz – Validation and verification methods and diagnostic tests in the microbiology laboratory	415

