

Kwartalnik

**Tom 56**

**Zeszyt 2•2017**

KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:

PMKMAV 56 (2)

2017

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 111,53 (2015)

Impact Factor ISI = 0,236 (2015)

Punktacja MNiSW = 15,00 (2015)

<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-KOMKOWSKA (Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),  
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 (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego), GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański),  
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

#### REDAKCJA

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), RADOŚLAW STACHOWIAK (zastępca), BOHDAN STAROŚCIAK (redaktor),  
PIOTR ZALESKI (sekretarz), MARTA BRZÓSTKOWSKA (korekta tekstów angielskich)

#### ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: 22 3786229, 22 5541312; fax 22 5541404  
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

#### Redaktorzy:

Redaktor naczelny: Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541304; fax 22 5541404  
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

Zastępca: Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541312; fax 22 5541404  
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

Redaktor: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa; tel.: 22 6280822, 22 6211351

Sekretarz: Instytut Biotechnologii i Antybiotyków  
ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa; tel. 22 3786229; e-mail: post.mikrobiol@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),  
EUGENIUSZ MAŁAFIEJ (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki),  
ANNA PRZONDO-MORDARSKA (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

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

*Komórki Neisseria gonorrhoeae, mutant szczepu FA1090.*

*Preparatyka: dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.  
Zdjęcie: mgr Paweł Bącał, Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrood, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,  
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski.*

*Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.*

---

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 820 egz., Objętość 14,5 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

Beata Tokarz-Deptuła<sup>1\*</sup>, Wiesław Deptuła<sup>2</sup>

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

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

Wpłynęło w lipcu 2016 r.

Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Probiotyki, a układ odpornościowy przewodu pokarmowego. 3. Podsumowanie

#### Probiotics and mammalian gastrointestinal immune system

**Abstract:** Probiotics are microorganisms that provide health benefits when consumed. These are also food supplements or food products containing specified probiotic microorganisms. Probiotic microorganisms colonize the gastrointestinal tract of the host environment, reducing the risk of pathogenic bacteria growth and their potential impact on the regulation of host immune responses. They also have the ability to eliminate pathogenic bacteria. The administration of probiotic microorganisms in addition to chemotherapeutic agents and antibiotics improves therapy efficiency, since it results in restoration of the equilibrium between the local and general pro- and anti-inflammatory response.

1. Introduction. 2. The probiotics and the gastrointestinal immune system. 3. Conclusions

**Słowa kluczowe:** komensale, odporność, probiotyki, przewód pokarmowy

**Key words:** commensals, immunity, probiotics, gastrointestinal tract

## 1. Wstęp

Podstawy naukowe dokumentujące korzystny wpływ mikroorganizmów probiotycznych na zdrowie człowieka i zwierząt podał w XX wieku rosyjski uczonec, laureat Nagrody Nobla, Ilja Miecznikow [43]. Obecnie probiotykami nazywamy drobnoustroje żywe lub martwe wyizolowane z przewodu pokarmowego zdrowego makroorganizmu lub samo DNA bakterii, które podawane jest do organizmu drogą pokarmową pod postacią leku, suplementu diety lub w formie produktu spożywczego [41, 54]. Drobnoustroje stosowane jako probiotyki powinny posiadać status GRAS (generally recognized as safe), co oznacza, że powinny być powszechnie przyjęte jako bezpieczne [13]. Pozytywną rolę probiotyków wykazano w wielu aspektach, potwierdzając ich korzystny wpływ na zdrowie, co stało się podstawą do wprowadzenia probiotykoterapii, a więc stosowania ich w terapii jak i profilaktyce oraz przy przywracaniu naturalnej mikroflory jelitowej, a także do produkcji żywności funkcjonalnej czy konserwacji produktów spożywczych [31, 32, 46]. Wykazano, że bakterie probiotyczne poprzez kolonizację w jelitach gospodarza, m.in. zmniejszają ryzyko przyrostu potencjalnych bakterii patogennych oraz oddziałują na bariery anatomiczno-fizyczne i mikrobiologiczne przewodu pokarmowego, a także wpływają na odporność makroorganizmu, w tym odporności lokal-

nej układu pokarmowego [15, 18, 31, 52]. Stwierdzono, że różne szczepy bakterii, mimo iż należą nawet do tego samego gatunku, mogą mieć zróżnicowany wpływ na organizm, dlatego przy doborze bakterii stosowanych w probiotykach, należy wybrać te, które wykazują dobre działanie kliniczne [26, 31]. Probiotyki ze względu na pozytywne oddziaływanie na układ odpornościowy, znalazły zastosowanie w przypadku wielu stanów patologicznych jak chociażby choroby infekcyjne przewodu pokarmowego [31, 43, 45, 49, 57], biegunki, w tym infekcyjne i po-antybiotykowe [19, 28, 50, 55, 60], schorzenia alergiczne [24, 36, 40, 54], nowotwory [10, 27, 30, 48, 59] oraz schorzenia zakaźne układu oddechowego i moczowo-płciowego [3, 15, 44, 54].

## 2. Probiotyki, a układ odpornościowy przewodu pokarmowego

Bakterie probiotyczne wykazują szerokie spektrum działania, w tym stymulujące na układ odpornościowy błon śluzowych (MALT – mucosa associated lymphoid tissue) – zwanego również wspólnym układem odpornościowym błon śluzowych – CMIS (common mucosal immune system) [9, 17, 47, 48]. Układ MALT czy CMIS tworzą m.in. elementy odporności przewodu pokarmowego (GALT – gut associated lymphoid tissue), układu oddechowego (BALM – bronchus associated lymphoid

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

tissue) oraz moczowo płciowego (GUALT – genitourinary associated lymphoid tissue), a także skóry (SALT – skin associated lymphoid tissue, choć innym określeniem tego zbioru komórek jest SIS – skin immune system) [8, 9, 17]. Odpowiedź immunologiczną układu MALT, cechuje się aktywizacją mechanizmów odporności naturalnej i nabytej, poprzez wytwarzanie całego szeregu cytokin, chemokin i czynników wzrostu, a także immunoglobulin klasy: G, M, A, w tym immunoglobuliny wydzielnicze S-IgA i S-IgM [9, 39, 47, 58]. Jako ostatnie wymienione przeciwciała min. opłaszczając i aglutynując mikroorganizmy, zapobiegają ich adhezji do nabłonka przewodu pokarmowego, choć także wykazują oddziaływanie regulujące, w tym poprzez przeciwciała S-IgM, na elementy układu odpornościowego (UO). Zatem układ MALT wykazuje nie tylko działanie bójcze, czy niszczące wobec bakterii, wirusów, grzybów i pasożytów ale także powoduje neutralizację toksyn bakteryjnych i grzybowych [8, 17, 21, 25, 33].

Lokalna odporność związana z błonami śluzowymi przewodu pokarmowego – GALT, utworzona jest m.in. przez tkankę limfatyczną skupioną i rozproszoną, związaną z błonami śluzowymi oraz komórki układu odpornościowego min. liczne granulocyty, monocyty i makrofagi, komórki tuczne, limfocyty T i B, w tym komórki plazmatyczne produkujące przeciwciała, ale także śród błonkowe limfocyty (IEL – intraepithelial lymphocyte) i naturalne komórki limfoidalne ILC (innate lymphoid cells), które to wydzielają wiele substancji min. o działaniu bójczym, modulującym, regulacyjnym i regeneracyjnym [1, 9, 23, 25, 48]. Tkankę limfatyczną GALT tworzą min. węzły chłonne, kępki Peyera tj. skupiska białych ciałek krwi w postaci skupionej i nieotorbionej, zbudowane z grudek limfatycznych wraz z komórkami M, samotne grudki limfatyczne, pojedyncze limfocyty, jak też izolowane grudki chłonne, przypominające swoją budową kępki Peyera z komórkami plazmatycznymi produkującymi IgA [9, 25]. Istotną rolę w jelitach ssaków spełniają również elementy tkanki limfoidalnej, jakimi są komórki Panetha znajdujące się w kryptach jelitowych, które syntetyzują defensyny – białka o działaniu m.in. przeciwbakteryjnym [8, 9, 17, 48]. GALT tworzą także ukryte krypty tzw. kryptokępki – luźno zorganizowane skupiska białek o charakterze receptorów interleukiny 7 (IL-7R), wykazujące bójcze i niszczące działanie na mikroorganizmy kolonizujące przewód pokarmowy [9, 17, 32]. Właściwość GALT wiąże się także z faktem, że przypada na niego ponad 70% komórek limfatycznych całego układu odpornościowego, w tym około 50% limfocytów, a także wytwarzanie w jego obrębie ok. 80% wszystkich immunoglobulin, wśród których szczególną rolę odgrywają wydzielnicze IgA (S-IgA) [4, 8, 9, 17].

Układ GALT, ze względu na intensywność występowania w poszczególnych odcinkach przewodu pokar-

mowego „chroni” różnie te odcinki. W jamie ustnej bariera odpornościowa utworzona jest głównie przez min. nabłonek wielowarstwowy płaski oraz wydzielane substancje bójcze zawarte w ślinie reprezentowane m.in. przez lizozym (LZM), defensyny oraz IgA (S-IgA), w żołądku głównym elementem obronnym jest niskie pH soku żołądkowego [8, 17, 25, 47]. Najbardziej zróżnicowanym pod tym względem mikrośrodowiskiem są niższe partie przewodu pokarmowego – jelita. W tych miejscach bardzo skuteczną ochroną m.in. przed patogennymi drobnoustrojami, są nie tylko elementy i komórki tworzące GALT ale także bakterie komensalne oraz składniki wydzielin gruczołów i komórek nabłonka przewodu pokarmowego, m.in. enzymy proteolityczne, fosfolipaza A, peptydy przeciwdrobnoustrojowe oraz śluz [17, 25, 47]. Ważnym elementem w tym odcinku przewodu pokarmowego, głównie w jelicie cienkim, jest nabłonek cylindryczny z enterocytami i komórkami kubkowymi wydzielającymi śluz [9, 17], a także komórki ILC [1, 20, 23]. Te ostatnie, jako naturalne komórki limfoidalne UO, stanowią bardzo swoisty i silny element naturalnej odporności, odgrywający także zasadniczą rolę w regulacji integralności nabłonka jelitowego jako bariery odpornościowej [1, 23]. Komórki ILC warunkują min. homeostazę w jelitach poprzez receptory MHC klasy II, które ograniczają reaktywność komórek T CD4+ na działanie bakterii komensalnych [1, 20, 23]. Wykazano, że homeostaza w przewodzie pokarmowym jest warunkowana także prawidłowym funkcjonowaniem nabłonkowej bariery jelitowej, która oddziela przestrzeń układu pokarmowego od tkanek makroorganizmu, umożliwiając jednocześnie interakcje pomiędzy mikroorganizmami, a UO makroorganizmu [12, 20, 47, 48, 57]. Ważnymi elementami odporności w przewodzie pokarmowym są występujące na strukturach tkanki GALT między innymi receptory TLR (Toll-like receptors), NLR (NOD-Like Receptors), a także znaczniki RLR (Rig-like receptors), TIM (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain), TAM (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain), TRIM (tripartite motif-containing proteins), których rola jest niezmiernie ważna w kontekście ich wpływu na poziom odporności [7, 21, 25, 42, 53]. Receptory te mają zdolność rozpoznawania nie tylko wzorców molekularnych zarasków patogennych – PAMP (patogen associated molecular patterns), ale także wzorców molekularnych bakterii komensalnych – CAMP (commensal associated molecular patterns) oraz wzorców molekularnych związanych z niebezpieczeństwem/uszkodzeniem – DAMP (danger/damage associated molecular patterns) – którymi są min. ATP, HSP, DNA, RNA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [16]. Inną ważną barierą odpornościową GALT jest błaszka właściwa błony śluzowej jelit, w której występują komórki UO, głównie makrofagi, granulocyty, komórki dendrytyczne i tuczne

oraz limfocyty B i T, które syntetyzują wiele substancji odpornościowych, w tym min. cytokiny, czynniki wzrostu i immunoglobuliny [8, 9, 17, 25, 29]. Te ostatnie jako produkty limfocytów B, powstające w wyniku oddziaływania min. probiotyków, są głównym składnikiem obrony przeciw bakteriom patogennym [17, 49, 57]. Natomiast rola limfocytów T i ich produktów, w wyniku oddziaływania choćby probiotyków, łączy się min. z regulacją odpowiedzi immunologicznej, poprzez cytokiny, w tym interleukiny, a także z ich cytotoksycznością oraz trogocytozą – którą to cechę wykazują także limfocyty B [1, 17, 25, 57]. Szczególnym miejscem odpowiedzi immunologicznej w obrębie GALT są kępkki Peyera, w których aktywowane są limfocyty B i T, które wędrując z krwią do błon śluzowych i struktur limfatycznych przewodu pokarmowego oraz gruczołów związanych z tkanką MALT i stają się także bardzo aktywne immunologicznie [8, 9, 17, 25]. Równie ważną rolę na powierzchni błony śluzowej jelita, spełniają komórki M występujące w nabłonku pęcherzykowatym kępek Peyera oraz nabłonek towarzyszący grudkom limfatycznym (FAE – follicle-associated epithelium), które to elementy (komórki M) wykazują zdolność transcytozy mikroorganizmów i makrocząsteczek ze światła jelita do wnętrza organizmu, celem przetworzenia i prezentacji ich przez komórki APC (antigen presenting cells) [4, 20, 33]. Bardzo ważną rolę warunkującą homeostazę w przewodzie pokarmowym oraz w funkcjonowaniu i rozwoju GALT ssaków stanowi komensalna mikroflora jelitowa, którą także reprezentują niektóre składniki probiotyków [20, 31, 34, 38, 52]. Rola tej mikroflory wynika i łączy się także z faktem, że tkankę MALT tworzy bardzo duża część leukocytów obecnych w całym organizmie ssaków, co gwarantuje że w wyniku oddziaływania na nie mikroorganizmów, powstaje silna reakcja immunologiczna, w tym lokalna.

Dowiedziano, że po dostaniu się antygenów, w tym mikroorganizmów probiotycznych do jelit, są one „rozpoznawane” w pierwszym rzędzie m.in. przez komórki nabłonkowe jelit, kępkki Peyera, w tym komórki M, a następnie dochodzi do ich prezentacji komórkom, w tym immunologicznie kompetentnym – to jest limfocytom T, choć także i B [8, 17, 20, 29]. Bakterie te oddziałują stymulująco także na takie elementy odporności naturalnej jak aktywność fagocytarna i cytotoksyczna granulocytów i makrofagów oraz bójczość komórek NK, które to komórki do tego działania nie wymagają antygenów zgodności tkankowej [3, 17, 20, 34, 38]. Wykazano, że produkty szczepów probiotycznych jakimi są białka bakteryjne *Bifidobacterium (B.) longum*, zwiększają m.in. poziom fosfodiesterazy alkalicznej w makrofagach, powodując zwiększenie ich aktywności bójczej w tym cytotoksycznej [49]. Bakterie te wraz z *Lactobacillus (L.) acidophilus*, aktywują także proces fagocytozy komórek PMN (granulocytów

obojętnochłonnych) i MN (monocytów i makrofagów) np. wobec patogennych bakterii *Salmonella enterica* ser. Typhimurium [17]. Natomiast takie produkty jak fosfopolisacharydy pochodzące ze szczepu *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* oraz *L. casei* w probiotykach, zwiększają liczbę komórek MN oraz zwiększają ich aktywność cytotoksyczną i fagocytarną. Mechanizm wzmagania aktywności komórek PMN oraz MN po stosowaniu probiotyków, łączy się także ze stymulującym oddziaływaniem IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  oraz IFN- $\alpha$ , które są produktami tych komórek, jak też zwiększaniem aktywności enterocytów, komórek dendrytycznych, a także komórek NK (natural killer) i ich subpopulacji [17, 35, 39]. Ważnym faktem jest i to, że aktywność i efektywność fagocytarna czy cytotoksyczna komórek PMN i MN, łączy się z poziomem opsonizacji drobnoustrojów przez produkty limfocytów B – immunoglobuliny – głównie IgA i IgG [8, 17, 25, 58]. Wykazano, że aktywność GALT poprzez probiotyki, warunkowana jest stymulacją komórek NK, ale także limfocytów T [25, 31, 33, 35, 49]. Aktywacja ludzkich komórek NK związana jest z ekspresją ich błonowych markerów, a także syntezą przez nie m.in. IFN- $\gamma$  i IL-12 [8, 17, 39, 47, 48]. Wykazano, że po podaniu *B. lactis* i *L. rhamnosus* – elementów probiotyków – rejestruje się zwiększoną cytotoksyczność komórek NK krwi obwodowej, nawet wobec linii komórek nowotworowych (K-562) [49]. Natomiast probiotyki zawierające pałeczki *Lactobacillus* sp. po kontakcie z jednojądrzastymi komórkami (komórki MN, limfocyty T, w tym NK) ssaczej krwi obwodowej, aktywują je do syntezy m.in. prozapalnych cytokin, oprócz IL-10, typu Th-1 jak: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-18 oraz IL-10 i INF- $\gamma$ , które są elementem determinującym min. działanie antibakteryjne i antywirusowe [5, 35, 37, 38, 57]. Wykazano, że większość szczepów *Lactobacillus* sp. nie wywołuje silnej aktywacji limfocytów T, ale powodują silną indukcję monocytów i makrofagów [38, 49, 57]. Stwierdzono, że bakterie probiotyczne wpływają na reaktywność komórek APC (antigen presenting cell – komórki prezentujące antygen), doprowadzając do efektu adjuwantowego [11, 49, 57]. Zarejestrowano także, że probiotyki wpływają na ogólną tolerancję immunologiczną wobec antygenów pokarmowych, poprzez oddziaływanie na komórki epitelialne i komórki dendrytyczne [49, 57]. Udowodniono, że zarówno bakterie probiotyczne, jak i bakterie komensalne, nie wywołują odpowiedzi prozapalnej skierowanej przeciw sobie, ale indukują nieswoiste mechanizmy odpornościowe – odporność naturalną, wpływając na utrzymanie homeostazy immunologicznej, przez co chronią makroorganizm przed działaniem drobnoustrojów chorobotwórczych [6, 27, 44, 45, 57]. Interakcja zachodząca między bakteriami probiotycznymi, a elementami i składnikami tworzącymi GALT, to także działanie związane z konkurencją o receptory

komórkowe z patogenami, co uniemożliwia tym ostatnim adhezję i kolonizację przewodu pokarmowego [47, 49, 57]. Probiotyki oddziałując na różne elementy GALT, nie tylko powodują wydzielanie wspomnianych wielu substancji czynnych, np.: cytokin, immunoglobulin, cząsteczek wzrostu, w tym takich substancji bójczych jak np.: lizozym, defensyny, ale także wpływają i wzmagają odnowę komórek przewodu pokarmowego [31, 49, 57]. Nadto bakterie probiotyczne aktywują działanie przeciwzapalne i regulacyjne układu odpornościowego, powstałe na skutek infekcji jelitowych [47, 57]. Składniki probiotyków takie jak np. *L. paracasei* CNCMI-4034 zmniejszają stan zapalny w jelitach, powstały w wyniku infekcji *Salmonella typhi*, poprzez zwiększenie ekspresji TLR2 na komórkach dendrytycznych, jak też wspomagają działanie TGF- $\beta$ 2 i zmniejszają wytwarzanie IL-6, IL-8, IL-12p70 i TNF- $\alpha$  przez komórki dendrytyczne [4]. Przyjmuje się, że wynik końcowy reakcji komórek gospodarza z bakteriami probiotycznymi, zależy od kombinacji różnych molekularnych wzorców związanych z mikroorganizmami (MAMP – microbe-associated molecular patterns), które mogą wchodzić w interakcje z różnymi receptorami PRR (pattern recognition receptors – receptory rozpoznające wzorce) [34].

Pozytywny efekt działania probiotyków zarejestrowano również w okresie starzenia się makroorganizmu, jako że stwierdzono iż bakterie probiotyczne „wrażliwiają” głównie wspomniane komórki dendrytyczne, gdyż w czasie tego procesu w makroorganizmie ssaków, zmienia się mikrośrodowisko jelit, co skutkuje stopniowym spadkiem funkcji odpornościowych makroorganizmu, w tym komórek DC, a co określa się jako immunostarczenie [11, 22, 38, 61]. Wprawdzie obserwacji tych w pełni nie potwierdzono w badaniach z wykorzystaniem bakterii probiotycznych takich jak *B. longum* bv. *infantis* CCUG 52486, *B. longum* SP 07/3, *L. rhamnosus* GG (L.GG) i *L. casei* Shirota (LcS), w których zarejestrowano tylko wzrost ekspresji swoistych dla komórek dendrytycznych receptorów, ale brak było wyraźnych i znaczących różnic klinicznych między osobami młodymi, a starszymi [61]. Znaczący jest jednak fakt, że komórki dendrytyczne osób starszych, w odpowiedzi na wspomniane bakterie probiotyczne, wykazały wzmożoną produkcję bardzo ważnych cytokin, jakimi są TGF- $\beta$  i TNF- $\alpha$ , w porównaniu do tej reakcji u osób młodszych [61]. Dobry efekt działania bakterii probiotycznych opisano także w patogenie niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease), gdyż stwierdzono, że komórki NKT (natural killer T-cells) wątroby, odgrywają istotną rolę w przebiegu tego schorzenia [35, 56]. Wykazano, że modyfikacja flory jelitowej u myszy, poprzez podanie probiotyków, prowadziła do zmian w aktywności komórek NKT

wątroby i poprawy stanu tego narządu [35]. W tych badaniach wykazano także, że myszy karmione wysoko tłuszczową dietą, w celu indukcji NAFLD, wykazywały silną reaktywność na różne dawki probiotyków, będące mieszkankami szczepów VSL3; bakterii probiotycznych *Bifidobacterium (B) infantis* oraz antybiotyków. Badania te dowiodły, że działanie takie, nie tylko pozytywnie wpływają w na liczbę komórek NKT w wątrobie i na tolerancję glukozy, ale także wykazano wpływ lipidowych ekstraktów z probiotyków na aktywność tych komórek [35]. W przypadku lipidów ekstrahowanych z VSL3, stwierdzono, że stymulują one komórki NKT, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, natomiast w przypadku lipidów z *B. infantis*, zarejestrowano że *in vitro*, obniżają one aktywność komórek NKT. Wyniki te sugerują, że zmiana we florze jelitowej ma duży wpływ na komórki NKT wątroby, choć zmiany te są specyficzne dla szczepu, który może zawierać bakteryjne antygeny glikolipidowe, które bezpośrednio modulują funkcje efektorowe wątrobowych komórek NKT [35].

### 3. Podsumowanie

Probiotyki wykazują istotny wpływ na elementy układu odpornościowego w przewodzie pokarmowym (GALT), co skutkuje podwyższoną odpornością lokalną, ale także ogólną, a co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia oddziaływania infekcji, w tym bakteryjnych, wirusowych i innych na makroorganizm. Efekt ten łączy się i zależy od odpowiedniego szczepu bakterii stosowanego w probiotyku i jest to, jak się wydaje, kluczowe dla uzyskania dobrego efektu w zastosowaniu probiotyków, chociaż na efekt ich działania ma także wpływ jego dawka i czas podawania, ale i status immunologiczny makroorganizmu.

### Piśmiennictwo

1. Adamiak M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Charakterystyka naturalnych komórek limfoidalnych (ILC). *Post. Hig. Med. Dośw.* **68**, 1464–1671 (2014)
2. Adamiak M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Sekretoryjna immunoglobulina klasy M (SIgM). *Kosmos*, **62**, 507–512 (2013)
3. Amdakar S., Singh V., Singh D.D.: Probiotic therapy: immunomodulating approach toward urinary tract infection. *Curr. Microbiol.* **63**, 484–490 (2011)
4. Bermudez-Brito M., Muñoz-Quezada S., Gomez-Llorente C., Matencio E., Bernal M.J., Romero F., Gil A.: Human intestinal dendritic cells decrease cytokine release against *Salmonella* infection in the presence of *Lactobacillus paracasei* upon TLR activation. *PLoS One*, **7**, e43197 (2012)
5. Bernardeau M., Vernaux J.P., Gueguen M.: Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *Int. J. Food Microbiol.* **77**, 19–27 (2002)
6. Cukrowska B.: Zastosowanie probiotyków w chorobach o podłożu immunologicznym. *Zakażenia*, **1**, 31–36 (2009)

7. Deptuła W., Tokarz-Deptuła B., Niedźwiedzka P.: Rola i znaczenie receptorów Toll-podobnych w odporności. *Post. Mikrobiol.* **45**, 221–231 (2006)
8. Deptuła W., Tokarz-Deptuła B., Stosik M.: Immunologia dla biologów Szczecin: Wyd. Uniwersytetu Szczecińskiego, 2013
9. Działo J., Niedźwiedzka-Rystwej P., Mękal A., Deptuła W.: Charakterystyka tkanki limfatycznej błon śluzowych przewodu pokarmowego i układu oddechowego. *Alergia Astma Immunol.* **15**, 197–202 (2010)
10. Femia A.P., Luceri C., Dolara P., Giannini A., Biggeri A., Salvadori M., Clune Y., Collins K.J., Paglierani M., Caderni G.: Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, **23**, 1953–1960 (2002)
11. Feyisetan O., Tracey C., Hellawell G.O.: Probiotics, dendritic cells and bladder cancer. *BJU Int.* **109**, 1594–1597 (2012)
12. Franczuk A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Rola mikroflory jelit w indukcji choroby Leśniowskiego-Crohna w świetle programu badań Human Microbiome Project. *Post. Mikrobiol.* **51**, 257–264, 2012
13. Fric P.: Probiotics and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle. *CEJ Med.* **2**, 237–270 (2007)
14. Fuller R.: Probiotics in human medicine. *Gut*, **32**, 439–442 (1991)
15. Gajewska J., Błaszczuk M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej. *Post. Mikrobiol.* **51**, 55–65 (2012)
16. Garg A.D., Agostinis P. i wsp.: Molecular and translational classifications of DAMPs in immunogenic cell death. *Frontiers Immunol.* **8**, 1–21 (2015)
17. Gołąb J., Jakóbiśiak M., Lasek W., Stokłosa T.: Immunologia. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 2013
18. Górka S., Jarzab A., Gamian A.: Bakterie probiotyczne w przewodzie pokarmowym człowieka, jako czynnik stymulujący układ odpornościowy. *Post. Hig. Med. Dośw.* **63**, 653–667 (2009)
19. Heczko P.B., Strus M., Jawień M., Szymański H.: Medyczne zastosowanie probiotyków. *Wiad. Lek.* **58**, 640–646 (2005)
20. Hepworth M.R., Sonnenberg G.F. i wsp.: Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*, **498**, 113–117 (2013)
21. Herbot M., Niedźwiedzka-Rystwej P., Deptuła W.: Receptory TLR a wybrane zakażenia bakteryjne, wirusowe, grzybicze i zarażenia pasożytnicze (w) Immunologia – fakty znane i nieznanne, red. W. Deptuła, B. Tokarz-Deptuła, R. Pisarski, Wyd. Państwowej Szkoły Zawodowej, Legnica-Szczecin, 2014, s. 123–128
22. Hopkins M.J., Sharp R., Macfarlane G.T.: Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*, **48**, 198–205 (2001)
23. Ishizuka I.E., Constantinides M.G., Gudjonson H., Bendelac A.: The innate lymphoid cell precursor. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 299–316 (2016)
24. Ivory K., Chambers S.K., Pin C., Prieto E., Arques J.L., Nicoletti C.: Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy*, **38**, 1282–1289 (2008)
25. Iwasaki A.: Exploiting mucosal immunity for antiviral vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 575–608 (2016)
26. Jach M., Łoś R., Maj M., Malm A.: Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Post. Mikrobiol.* **52**, 161–170 (2013)
27. Kaur I.P., Chopra K., Saini A.: Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**, 1–9 (2002)
28. Kaźmierska A.: Probiotyki – recepta na zdrowie. *Kosmos*, **3**, 455–472 (2014)
29. Koch M.A., Reiner G.L., Lugo K.A., Kreuk L.S.M., Stanbery A.G., Ansaldo E., Seher T.D., Ludington W.B., Barton G.M.: Maternal IgG and IgA antibodies dampen mucosal T Helper cell responses in early life. *Cell*, **165**, 827–841 (2016)
30. Książyk J.: Probiotyki i prebiotyki w karcynogenezie. *Ped. Współ. Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziecka*, **4**, 61–62 (2002)
31. Kubiszewska I., Januszewska M., Rybka J., Gackowska L.: Bakterie kwasu mlekowego i zdrowie: czy probiotyki są bezpieczne dla człowieka? *Post. Hig. Med. Dośw.* **68**, 1325–1334 (2014)
32. Kuśmierska A., Fol M.: Właściwości immunomodulacyjne i terapeutyczne drobnoustrojów probiotycznych. *Probl. Hig. Epidemiol.* **95**, 529–540 (2014)
33. Lavin Y., Mortha A., Rahman A., Merad M.: Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 731–744 (2015)
34. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.: Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 171–184 (2010)
35. Liang S., Webb T., Li Z.: Probiotic antigens stimulate hepatic natural killer T cells. *Immunology*, **141**, 203–210 (2014)
36. Łoś-Rycharska E., Czerwionka-Szaflarska M.: Probiotyki w zapobieganiu i leczeniu alergii. *Pediatrics Polska*, **87**, 478–488 (2012)
37. Maeada N., Nakamura Y., Hirose Y., Murosaki S., Yamamoto Y., Kase T., Yoshikai Y.: Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 1122–1125 (2009)
38. Meijerink M., Wells J.M.: Probiotic modulation of dendritic cells and T cell responses in the intestine. *Benef. Microbes*, **1**, 317–326 (2010)
39. Michałkiewicz J., Krotkiewski M., Gockowska L., Wyszomirska-Golda M., Helmin A., Dzierżanowska D., Madaliński K.: Immodulujący wpływ probiotyków na reakcje odpornościowe, [http://www.imed.pl/index.php?PAGE=telegram&TEL\\_CUR\\_ID=138&return=archives](http://www.imed.pl/index.php?PAGE=telegram&TEL_CUR_ID=138&return=archives) (05.04.2017)
40. Minnicozzi M., Sawyer R.T., Fenton M.J.: Innate immunity in allergic disease. *Immunol. Rev.* **242**, 106–127 (2011)
41. Mojka K.: Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki – charakterystyka i funkcje. *Probl. Hig. Epidemiol.* **95**, 541–549 (2014)
42. Niedźwiedzka-Rystwej P., Mękal A., Deptuła W.: Nowe dane o receptorach TLR i ich rola w przewodzie pokarmowym: w „Immunologia – fakty znane i nieznanne”, red. W. Deptuła, B. Tokarz-Deptuła, R. Pisarski, Wyd. Państwowej Szkoły Zawodowej, Legnica-Szczecin, 2014, s. 113–117
43. Nowak A., Śliżewska K., Libudysz Z., Socha J.: Probiotyki – efekty zdrowotne. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, **71**, 20–36 (2010)
44. Popova M., Molimard P., Courau S., Crociani J., Dufour C., Le Vacon F., Carton T.: Beneficial effects of probiotics in upper respiratory tract infections and their mechanical actions to antagonize pathogens. *J. App. Microb.* **113**, 1305–1318 (2012)
45. Rachmilewitz D., Karmeli F., Takabayashi K., Hsyashi T., Leider-Trejo L., Lee J., Leoni L.M., Raz E.: Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology*, **122**, 1428–1441 (2002)
46. Rather I.A., Bajpai V.K., Kimar S., Lim J., Paek W.K., Park Y.H.: Probiotics and atopic dermatitis: An overview. *Frontiers Microbiol.* **7**, 1–7 (2016)
47. Ray A., Dittel B.N.: Interrelatedness between dysbiosis in the gut microbiota due to immunodeficiency and disease penetrance of colitis. *Immunology*, 2015, **146**, 359–368.
48. Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J.B., Aquino-Michaels K., Earley Z.M., Benyamin F.W., Lei Y.M., Jabri B.,

- Alegre M.L., Chang E.B., Gajewski T.F.: Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*, **350**, 1084–1089 (2015)
49. Surma D.: Wpływ probiotyków na układ immunologiczny człowieka. *J. NutriLife* 2012, <http://www.NutriLife.pl/index.php?art=33> (18.07.2014)
  50. Szachta P., Adamska A., Gałęcka M., Cichy W., Roszak D.: Rola probiotyków w chorobach alergicznych. *Pediatrics Współcz. Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziecka* 2011, s. 181–183
  51. Szachta P., Pazgrat M., Cichy W., Muszyński Z., Ignyś I.: Szczepy probiotyczne – perspektywy i bezpieczeństwo. *Gastroenterol. Pol.* **16**, 37–41 (2009)
  52. Śliwa-Dominiak J., Deptuła W.: Mikroorganizmy komensaliczne u ssaków – wybrane dane, *Medycyna Wet.* **66**, 383–388 (2010)
  53. Śliwa-Dominiak J., Deptuła W.: RLR receptors – important elements of innate immunity. *Centr. Europ. J. Immunol.* **36**, 117–119 (2011)
  54. Tokarz-Deptuła B., Śliwa-Dominiak J., Adamiak M., Deptuła W.: Probiotyki a wybrane schorzenia u ludzi. *Post. Mikrobiol.* **54**, 133–140 (2015)
  55. Trafalska E., Grzybowska K.: Probiotyki – alternatywa dla antybiotyków? *Wiadomości Lek.* **57**, 491–497 (2004)
  56. Trzeciak-Rydzek A., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Immunity of the liver – selected data. *Centr. Europ. Immunol.* **36**, 193–196 (2011)
  57. Vieira A.T., Teixeira M.M., Martins F.S.: The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front. Immunol.* **4**, 445 (2013)
  58. Vong L., Lorentz R.J., Assa A., Glogauer M., Sherman P.M.: Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* **192**, 1870–1877 (2014)
  59. Wasilewska E., Złotkowska D., Pijagin M.E.: Rola mikroflory jelitowej i bakterii probiotycznych w profilaktyce i rozwoju raka jelita grubego. *Post. Hig. Med. Dośw.* **67**, 837–847 (2013)
  60. Wiese M., Andryszczyk M., Eijaszewicz A., Kubiszewska I., Helmin-Basa A., Kaszewski W., Gackowska L., Urbańska M., Motyl I., Michałkiewicz J.: Szczepy bakterii probiotycznych oraz ich zastosowanie w wybranych jednostkach chorobowych (w) Wpływ czynników endogennych i egzogennych na układ odpornościowy. Wybrane aspekty bezpieczeństwa stosowania probiotyków, red. E. Skopińska-Różewska, A.K. Siwicki, ed. S. c. Olsztyn, 2012, s. 223–232
  61. You J., Dong H., Mann E.R., Knight S.C., Yaqoob P.: Probiotic modulation of dendritic cell function is influenced by ageing. *Immunobiology*, **219**, 138–148 (2014)



Olga Goławska<sup>1</sup>, Marta Demkowska-Kutrzepa<sup>2</sup>, Ewa Borzym<sup>3</sup>, Paweł Różański<sup>4</sup>,  
Magdalena Zając<sup>1</sup>, Artur Rzeżutka<sup>5</sup>, Dariusz Wasyl<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,

<sup>2</sup>Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

<sup>3</sup>Zakład Chorób Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

<sup>4</sup>Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

<sup>5</sup>Zakład Wirusologii Żywności i Środowiska, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Wpłynęło w lipcu 2016 r.

Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Inwazyjne gatunki żółwi. 3. Bakterie. 3.1. *Salmonella* spp. 3.1.1. Reptile Associated Salmonellosis (RAS). 3.2. Prątki. 3.3. Inne bakterie. 4. Parazytofauna żółwi. 4.1. Żółwie inwazyjne źródłem zarażenia helmintami żółwia błotnego. 4.2. Występowanie i patogenność obcych pasożytów u natywnych i obcych gatunków żółwi. 5. Infekcje wirusowe. 6. Infekcje grzybicze. 7. Podsumowanie

#### Microflora and parasitofauna of alien and invasive turtle species

**Abstract:** Invasiveness of alien turtles results from their impact on the functioning of the local ecosystem. It is due to predation on or competing with resident species, but also transfer of new and unknown pathogenic bacteria, viruses, parasites, or fungi. *Salmonella* is the most often reported microorganism, both in free-living and captive turtles. Zoonotic aspect of *Salmonella* spp. carriage has led to the definition of RAS (Reptile Associated Salmonellosis) acquired from domestic pet reptiles. *Mycobacterium* spp., *Leptospira* spp. and aquatic bacteria are also found in turtles. Additionally, nematode transmissions from invasive turtles to the autochthonic ones have been described. Alien turtles were less affected by parasitic invasion than animals living in a native location, but the infestation of alien parasites in native turtle species was usually more severe. Reports on viral or fungal infections in turtles are scarce. The identified knowledge gaps justify the need for research which will provide basic and systematic data on microbial threats related to alien and invasive turtles present in the natural environment of Poland. It will also give more insight in the scope and the impact of the problem on epidemiology and public health.

1. Introduction. 2. Invasive turtle species. 3. Bacteria. 3.1. *Salmonella* spp. 3.1.1. Reptile Associated Salmonellosis (RAS). 3.2. Mycobacteria. 3.3. Other bacteria. 4. Parasitofauna of turtles. 4.1. Invasive turtles as a source of helminth invasion of European pond turtle. 4.2. Occurrence and invasiveness of alien parasites in native and alien turtles. 5. Viral infections. 6. Mycotic infection. 7. Conclusions

**Słowa kluczowe:** bakterie, grzyby, inwazyjne gatunki żółwi, pasożyty, wirusy

**Key words:** bacteria, fungi, invasive turtle species, parasites, viruses

## 1. Wstęp

Jedną z cech ekosystemu jest tendencja do utrzymania i odtwarzania charakterystycznej struktury i funkcji. Jednocześnie stopniowe zmiany w ekosystemach są skutkiem migracji i kolonizacji przez organizmy żywe nowych obszarów. Ten naturalnie powolny proces uległ gwałtownemu przyspieszeniu w wyniku globalizacji handlu i przemieszczania się ludności. Nowe gatunki zwierząt i roślin pojawiające się w ekosystemie są określane mianem gatunków obcych. Ich utrzymywanie się ma zwykle charakter neutralny, jednak niektóre mogą mieć niekorzystny wpływ na równowagę ekosystemu i jako gatunki inwazyjne stanowić zagrożenie dla bioróżnorodności. Możliwe oddziaływania polegają na zmienianiu siedlisk i żerowisk, konkurencji i zastępowaniu gatunków rodzimych lub tworzeniu z nimi hybryd genetycznych [61].

## 2. Inwazyjne gatunki żółwi

Szacuje się, że w krajach Unii Europejskiej (UE) występuje około 12 000 obcych gatunków roślin, grzybów, zwierząt i drobnoustrojów. Gady stanowią nieliczną grupę gatunków obcych. Zgodnie z obowiązującymi przepisami [60] w Polsce za inwazyjne uznaje się cztery gatunki żółwi: ozdobnego, malowanego, ostrogrzbietego i jaszczurowatego. Występowanie dwóch pierwszych – *Trachemys (T.) scripta* i *Chrysemys (Ch.) picta* – ze względu na istotne szkody jakie powodują w środowisku, wymaga podjęcia działań zapobiegawczych zmierzających do ograniczenia ich rozprzestrzeniania na terenie Europy [61], a ich wprowadzanie jest zakazane [62]. Wymienione gatunki żółwi naturalnie zamieszkują centralną i wschodnią część Ameryki Północnej. Ze względu na niewielkie rozmiary, atrakcyjny wygląd i niewymagające warunki hodowlane,

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; tel. 81 889 33 70; e-mail: wasyl@piwet.pulawy.pl

w drugiej połowie XX w. stały się popularnymi zwierzętami hobbystycznymi. Szczególną popularnością cieszyły się różne podgatunki *T. scripta*. Ich celowe lub przypadkowe przedostanie się do środowiska naturalnego uważa się za największe znane wprowadzenie obcego gatunku inwazyjnego na świecie. Badania przeprowadzone we Włoszech wykazały większy zasięg terytorialny i znaczną przewagę liczebną obcego *T. scripta* nad rodzimym żółwiem błotnym *Emys orbicularis* [70], który w Polsce i wielu krajach europejskich jest objęty ścisłą ochroną i każdy gatunek obcy może przyczynić się do jego wyginięcia [69].

Oprócz wcześniej wspomnianych sposobów oddziaływania gatunków inwazyjnych na środowisko i bytujące w nim gatunki autochtoniczne, należy również wziąć pod uwagę organizmy zasiedlające wprowadzany gatunek. Towarzyszące im bakterie, grzyby, pasożyty czy wirusy mogą również wpływać na równowagę ekosystemu. Celem niniejszego artykułu jest przegląd dostępnych danych literaturowych dotyczących bakterii, pasożytów, wirusów, drożdżaków i pleśni stwierdzanych u żółwi gatunków inwazyjnych. Szczególną uwagę zwrócono na zwierzęta obecne w środowisku, tak w obszarze ich naturalnego występowania, jak i introdukowane, oraz notowane u nich czynniki chorobotwórcze o potencjalnym wpływie na zdrowie i życie człowieka oraz zwierząt.

### 3. Bakterie

#### 3.1. *Salmonella* spp.

Bakteriami najczęściej kojarzonymi z gadami, w tym z żółwiami, są pałeczki z rodzaju *Salmonella* spp. Przyjmuje się, że stanowią one fizjologiczną składową flory jelitowej gadów. Pomimo to, wyniki badań naukowych nie są kompletne i jednoznaczne. Często rozbieżne wnioski z takich analiz mogą wynikać ze stosowania różnych metod diagnostycznych, takich jak badania bakteriologiczne i serologiczne [11, 13, 23, 29, 43] lub wykrywanie materiału genetycznego zarazka metodą PCR [22, 27, 57, 69], czy też wykorzystywania różnych rodzajów próbek (kał, wymazy z kloaki lub karapaksu, błona śluzowa jelit, osad z terrarium) [22, 30, 45, 57, 64]. Nie bez znaczenia na różnorodność otrzymywanych wyników badań laboratoryjnych ma też miejsce pochodzenia zwierząt: hodowle, ogrody zoologiczne lub środowisko – tak ich naturalnego zasięgu geograficznego, jak i obszarów, na których są one gatunkami obcymi. Dla przykładu, częstość występowania *Salmonella* spp. u żółwi *Ch. picta* i *Ch. serpentina serpentina* (żółw jaszczurowaty) w Ameryce Północnej sięgała 100% [11], chociaż żółwie tych gatunków oraz *T. scripta scripta* (żółw żółtobruchy) i *T. scripta elegans*

(żółw czerwonolicy) bywały też wolne od *Salmonella* spp. [47, 58, 64]. Jedne badania wskazują, że występowanie patogenu u *T. scripta elegans* nie ma związku z wielkością żółwia, jego kondycją i środowiskiem zbiornika wodnego, z którego został odłowiony [22, 57]. Z kolei w Chinach częściej izolowano te bakterie od inwazyjnych *T. scripta elegans* o karapaksie mniejszym niż 10 cm w porównaniu do zwierząt o większych wymiarach [68]. W badaniach przeprowadzonych w Hiszpanii nie wykryto *Salmonella* spp. u przedstawicieli inwazyjnych gatunków *Graptemys (G.) pseudo-geographica* (żółw ostrogrzbiety) i *T. scripta scripta*, a u *T. scripta elegans* zarazek stwierdzano u 5,68% odłowionych osobników [30]. Wszystkie *Ch. picta* w ogrodzie zoologicznym w Nowym Jorku były nosicielami *Salmonella* spp., podczas gdy bakterie te odnotowano tylko u 12,5% *T. scripta elegans* [53]. Patogen nie występował w hodowlach żółwi ozdobnych, ostrogrzbietych i malowanych w Hiszpanii [30], Niemczech i Austrii [23] i w Japonii, w przypadku *Ch. serpentina* [50].

Informacje dotyczące występowania *Salmonella* spp. u żółwi zaliczanych do gatunków inwazyjnych, zwłaszcza hodowanego w domach *T. scripta*, w Polsce mają charakter incydentalny. Przeprowadzone w ostatnich latach badania własne objęły zaledwie sześć żółwi gatunków inwazyjnych, z których jedynie u jednego osobnika *Ch. serpentina* stwierdzono występowanie *Salmonella* spp. [75].

Jeszcze rzadsze są informacje na temat objawów klinicznych na tle zakażeń *Salmonella* spp., których wystąpienie ma związek zwykle z obniżeniem odporności gada [54, 65, 69]. Są to głównie stany zapalne w obrębie układu pokarmowego i oddechowego, a przy infekcji szczepem silnie wirulentnym może pojawić się sepsa prowadząca do upadków zwierząt [35, 42, 69]. O wiele częściej zakażenie przebiega bezobjawowo, z okresowym siewstwem zarazka w kale, któremu sprzyja stres spowodowany schwyтaniem, transportem, dużym zagęszczeniem osobników w terrarium, przewlekłą chorobą lub złymi warunkami hodowli [54, 65].

#### 3.1.1. „Reptile Associated Salmonellosis (RAS)”

Fakt siewstwa w połączeniu z szacowanym przez amerykańskie Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorobom (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) na ponad 90% nosicielstwem *Salmonella* spp. u gadów [64] stanowi istotne zagrożenie zdrowia człowieka. Zatrucia pokarmowe wywołane przez odzwierzęce szczepy *Salmonella* spp. mają najczęściej łagodny przebieg. Niekiedy jednak mogą mieć charakter uogólniony, z zejściem śmiertelnym włącznie [4, 11, 13]. Nie tylko zanieczyszczona żywność, ale również kontakt z gadami może być przyczyną salmonellozy człowieka. CDC szacuje, że RAS może odpowiadać

za ok. 6% z 1,4 miliona zachorowań na salmonellozę u ludzi w USA [4, 58, 68]. W Europie epidemiologia salmonellozy, której źródłem zakażenia są gady, jest ciągle niewystarczająco poznana [8]. Dostrzeżenie problemu RAS u dzieci w USA doprowadziło w 1975 r. do zakazu sprzedaży żółwi o karapaksie mniejszym niż 10 cm. Zakaz wynikał z faktu, że dzieci w trakcie zabawy wkładały małe żółwie do ust, co skutkowało transmisją zarazki [4, 57]. Do ograniczenia liczby zachorowań przyczyniła się również akcja informacyjna i wydanie przez CDC wskazówek dla hodowców gadów (<http://www.cdc.gov/features/salmonellafrogturtle/>).

Rozpoznanie RAS może ułatwić identyfikacja serowaru odpowiedzialnego za zakażenie, jak miało to miejsce w przypadku sześciolatniej Japonki, u której zachorowanie przebiegało z objawami m.in. gorączki, wymiotów, bólu brzucha i wodnistej biegunki oraz łagodnej niewydolności wątroby. Dalsze badania potwierdziły tożsamość wyizolowanego serowaru *S. Paratyphi B* z izolatem pochodzącym od *T. scripta elegans*, którym dziewczynka się opiekowała [49]. Wbrew powszechnej opinii, że zwierzęta zmiennocieplne są źródłem serowarów reprezentujących inne podgatunki niż *S. enterica* subsp. *enterica*, od żółwi izolowano liczne serowary należące do tego podgatunku: *S. Anatum*, *S. Galiens*, *S. Typhimurium*, *S. Thompson*, *S. Litchfield*, *S. Chailey*, *S. Seftenberg*, *S. Stanley*, *S. Newport*, *S. Give*, *S. Hull*, *S. Potsdam*, *S. Bredeney*. Stwierdzano także przedstawicieli podgatunku *salamae* 4,12,27:b:[e,n,x], *arizonae*, *houtenae* 44:z<sub>4</sub>z<sub>23</sub>:-, *diarizonae* 38:1,v:z<sub>35</sub> [11, 30, 43, 68, 70]. W badaniach własnych uzyskano 46 izolatów należących do 29 serowarów reprezentujących 3 podgatunki *S. enterica*: *enterica* (78,26%), *salamae* (19,57%) i *diarizonae* (2,17%). Najczęściej notowano *S. enterica* subsp. *enterica* 4,5:b:-, *S. Oranienburg*, *S. Fluntern* oraz *S. Tennessee*, przy czym ten pierwszy wraz z *S. Minnesota* został wyizolowany również od osobnika zaliczanego do gatunku inwazyjnego [75]. W większości opublikowanych badań diagnostyka zakażeń żółwi ograniczała się jednak do samego wykrycia zarazki, bez jego pełnej identyfikacji serologicznej [22, 45, 57]. Fakt ten, w połączeniu z przekraczającą 2500 liczbą serowarów *Salmonella* [36] świadczy o niewystarczającym poziomie wiedzy dotyczącej epidemiologii *Salmonella* spp. występujących u gadów.

### 3.2. Prątki

Innymi bakteriami o potencjale zoonotycznym są *Mycobacterium* spp. Notowano je u gadów wykazujących niespecyficzne objawy kliniczne, jak obrzęk kończyn i spadek masy ciała przy niezmiennym apetycie, oraz u osobników zdrowych klinicznie [19, 42]. W preparatach histologicznych obserwowano zmiany martwicze z naciekiem histiocytarnym (ziarniniaki)

wynikające z zakażenia *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. thamnophaeos*, *M. ulcerans*, *M. avium* [71]. W przeciwieństwie do ziarniniaków gruźliczych stwierdzanych u ssaków, zmiany te nie przejawiały cech zwapnienia [35, 71]. Mechanizm transmisji zarazki nie jest poznany, jednak podejrzewa się, że wrotami zakażenia jest układ pokarmowy lub uszkodzona skóra. Ziarniniaki spowodowane przez prątki obserwowano u żółwi w płucach, wątrobie, śledzionie, skórze i tkance podskórnej, jamie gębowej, gonadach, kościach i ośrodkowym układzie nerwowym [42]. U niektórych osobników obecność prątków wykrywano metodą PCR, wyniki te nie znajdowały jednak potwierdzenia w badaniach histologicznych. Prątki należały do grupy MOTT (*Mycobacterium Other Than Tuberculosis*) oraz *M. haemophilum* i *M. nonchromogenicum*, które mogą być patogenami oportunistycznymi dla człowieka [71]. W badaniach klinicznie zdrowych gadów pochodzących z hodowli *M. fortuitum*-like wykryto u *Ch. picta* [19].

### 3.3. Inne bakterie

Doniesienia na temat występowania u żółwi innych bakterii chorobotwórczych są niezmiernie rzadkie. W badaniach popłuczyny z jamy nosowej stwierdzano *Mycoplasma* spp., a odsetek wyników dodatnich u zwierząt odłowionych w różnych miejscach tego samego zbiornika wodnego wahał się od 0% do 14,3% [69]. Bakterie te występowały w wymazach z worka spojówkowego zarówno wśród zwierząt utrzymywanych w niewoli, jak i odłowionych ze środowiska naturalnego. Z tych samych próbek wyizolowano też *Staphylococcus lentus* i *Proteus* spp. [14]. W badaniach przeprowadzonych w Słowenii stwierdzono, że gady mogą być rezerwuarem *Leptospira* spp., ale stwierdzone u 13,8% żółwi czerwonolich miana przeciwciał były niższe niż w przypadku żółwia błotnego i były skierowane wyłącznie przeciwko serowarowi Tarassovi [40]. Z kolei, swoiste przeciwciała przeciwko licznym serowarom *Leptospira* spp. stwierdzono aż u 89,1% żółwi czerwonolich odłowionych w USA [3].

W nielicznych przypadkach prowadzono ocenę jakościową składu flory jelitowej żółwi. Izolowano *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Providencia* spp., *Proteus* spp., *Aeromonas* spp., *Citrobacter freundii* [26, 47, 53, 70]. Stwierdzono między innymi, że koncentracja bakterii wydalanych z kałem przez żółwie może być wyższa niż w przypadku ssaków, ale jest to zjawisko sezonowe, związane z zależną od temperatury otoczenia aktywnością życiową zwierząt zmiennocieplnych [26]. Dodatkową zmienną może być okresowe siewstwo bakterii potencjalnie chorobotwórczych [47].

#### 4. Parazytofauna żółwi

Występowaniu pasożytów u inwazyjnych gatunków żółwi sprzyja fakt, że w większości przypadków jest to pierwsze lub drugie pokolenie zwierząt odłowionych z natury. Zawleczeniu pasożyta wraz z żywicielem do nowego regionu geograficznego (co-introduced parasite) towarzyszy zjawisko wikariatu parazytologicznego (co-invasive parasite), tj. zarażenia natywnych gatunków żywicieli przez pasożyta obcego w danym środowisku [41]. W odróżnieniu od zakażeń bakteryjnych, infekcje pasożytnicze nie mają charakteru zoonotycznego. Transmisja pasożytów ma miejsce zwykle pomiędzy gatunkami żółwi inwazyjnych i żółwiem błotnym, czemu sprzyja podobieństwo organizmów i warunków ich bytowania. Skutkiem takiej transmisji, obok eks-

pansji terytorialnej, jest również ekspansja żywicielska (host switching) [34, 41].

##### 4.1. Żółwie inwazyjne źródłem zarażenia helmintami żółwia błotnego

Najwięcej doniesień na temat występowania pasożytów u żółwi w ich środowisku naturalnym dotyczy żółwia czerwonoliciego, u którego stwierdzano wiele gatunków helmintów. Ta grupa pasożytów pojawia się najczęściej w nowym środowisku wraz z obcym gatunkiem żywiciela [41]. Zawleczone pasożyty przyczyniają się do wysokiej zachorowalności oraz śmiertelności gatunków natywnych, takich jak *Emys orbicularis* [56, 67]. W tabeli I przedstawiono gatunki pasożytów występujących u żółwi w Ameryce Północnej i w Euro-

Tabela I  
Helminty występujące u żółwi w Ameryce Północnej i Europie

Typ	Rodzina	Gatunek	Ameryka Płn.	Europa	
				Żółw ozdobny	Żółw błotny
Przywry	<i>Heronimidae</i>	<i>Heronimus mollis</i>	[59]		
		<i>Plagiorchis mutations</i>			[38]
	<i>Polystomatidae</i>	<i>Neopolystoma orbicularis</i>	[20, 59, 73]	[73]	[73]
		<i>Polystomoides coronatum</i>	[20]		
		<i>Polystomoides ocellatum</i>			[38, 46, 72]
		<i>Polystomoides oris</i>	[73]	[73]	[73]
	<i>Spirorchiiidae</i>	<i>Spirhpalum polesianum</i>			[34, 46]
		<i>Spirorchis elegans</i>	[34]		[34]
		<i>Spirorchis artericola</i>	[20, 51]		
	<i>Telorchiiidae</i>	<i>Telorchis assula</i>			[38]
<i>Telorchis parvus</i>				[38]	
<i>Telorchis stossichi</i>				[38]	
Kolecogłowy	<i>Neoechinorhynchidae</i>	<i>Neoechinorhynchus emyditoides</i>	[7, 20, 59]		
		<i>Neoechinorhynchus pseudemydis</i>	[7, 59]		
		<i>Neoechinorhynchus chrysemydis</i>	[7, 59]		
		<i>Neoechinorhynchus stunkardi</i>	[7, 59]		
		<i>Neoechinorhynchus schmidti</i>	[7]		
		<i>Neoechinorhynchus constrictus</i>	[7]		
Nicienie	<i>Ascarididae</i>	<i>Angusticaecum holopterum</i>		[74, 76]	[74]
	<i>Camallanidae</i>	<i>Camallanus</i> spp.		[56]	[56]
		<i>Serpinema microcephalus</i>		[31–32]	[31, 38, 74]
		<i>Serpinema trispinosum</i>	[20, 48, 59]		
	<i>Cosmocercidae</i>	<i>Aplectana</i> spp.		[31]	
	<i>Gnathosomatidae</i>	<i>Spiroxys contortus</i>	[20, 48, 59, 74]		[38, 46]
	<i>Kathlaniidae</i>	<i>Falcaustra affinis</i>	[20, 48, 59]		
		<i>Falcaustra armenica</i>			[38, 46, 74]
		<i>Falcaustra donanensis</i>		[31]	
		<i>Falcaustra wardi</i>	[51]		
<i>Oxyuridae</i>	<i>Tachygonetria</i> spp.		[56]	[56]	
<i>Physalopteridae</i>	<i>Physaloptera</i> spp.		[31]		

pie, z których część była dotąd opisywana u amerykańskich żółwi słodkowodnych, a ich stwierdzenie zarówno u egzotycznych jak i autochtonicznych żółwi europejskich może świadczyć o ekspansji żywicielskiej. Należy tu wymienić nicienie *Angusticaecum holopteryum* [74, 76], *Camallanus* spp. i *Tachygonetria* spp. [56], *Serpinema microcephalus* [31, 38] oraz przywry *Neopolystoma orbiculare* i *Polystomoidesoris* [73]. Dwa ostatnie gatunki opisane u *E. orbicularis* we Francji [73], dotarły do Europy jako gatunki zawleczone, podobnie jak stwierdzony w Hiszpanii *Spirorchis elegans* [34] oraz *Spiroxys contortus* obserwowany w Rumunii i Bułgarii [38, 46], który dotąd opisywany był jedynie na kontynencie amerykańskim (Tabela I). Przykłady te dowodzą introdukcji pasożyta do nowego regionu geograficznego i jego transmisji z żółwi egzotycznych na autochtoniczne gatunki [34]. Nie wyjaśniona pozostaje inwazja nicieniem *Angusticaecum holopteryum* u *T. scripta elegans* w ogrodzie zoologicznym. Można jednak przypuszczać, że doszło do transmisji pasożyta od innego żółwia egzotycznego [76]. Dotychczas nicien ten opisywany był w Europie jako pasożyt *E. orbicularis* [74, 76]. Zaznaczyć należy, że *Angusticaecum holopteryum*, *Tachygonetria lobata* i *Tachygonetria robusta* figurują w wykazie gatunków obcych, wprowadzonych i zawleczonych do Polski [24].

Istnieją także doniesienia o występowaniu u żółwi błotnych nicieni typowych dla płazów lub jaszczurek, takich jak *Physaloptera abbreviata* lub *Aplectana* spp., które dla żółwi były prawdopodobnie pasożytami przypadkowymi [31]. Ekspansja żywicielska zachodzi także w odwrotnym kierunku tj. z żółwi rodzimych na gatunki inwazyjne. Opisany w Hiszpanii przypadek dotyczył przeniesienia inwazji *Serpinema microcephalus* i *Falcaustra donanaensis* z żółwia błotnego na *T. scripta elegans* [32]. *Serpinema microcephalus* występuje powszechnie u żółwi w regionie palearktycznym [31, 38], podczas gdy żółwie czerwonolice w natywnym środowisku ulegają zarażeniu innym gatunkiem tego nicienia – *Serpinema trispinosum*. Stąd też należy przypuszczać, że oba gatunki nicieni zajmują podobną niszę ekologiczną na różnych kontynentach.

#### 4.2. Występowanie i patogenność obcych pasożytów u natywnych i obcych gatunków żółwi

Analizując doniesienia dotyczące helmintofauny można zauważyć, że żółwie introdukowane do Europy zwykle wykazują mniejszą intensywność inwazji pasożytami niż osobniki występujące w naturalnym siedlisku. Może to wynikać z braku możliwości zakończenia cyklu rozwojowego obcych pasożytów w nowym środowisku [77]. Z kolei intensywność inwazji egzotycznych gatunków helmintów, przeniesionych przez żółwie egzotyczne na gatunki autochtoniczne jest zwykle

większa. Na przyczynę tego zjawiska może składać się wiele elementów, wśród których wymienia się poziom wirulencji pasożyta, większą wrażliwość żółwi autochtonicznych na zarażenie, czy też brak koewolucyjnej historii pasożyta i żywiciela [10, 41]. Zjawisko to potwierdzają badania hiszpańskie [31], w których typowego dla Europy nicienia *Serpinema microcephalus* obserwowano częściej u żółwi czerwonolice (93,8%) niż błotnych (66,7%). Jednocześnie częstość zakażeń amerykańskim odpowiednikiem nicienia (*Serpinema trispinosum*) u autochtonicznych żółwi czerwonolice kształtowała się na nieco niższym poziomie (85,7%) [20]. W tym samym regionie u żółwi czerwonolice pasożytuje *Spiroxys contortus* [20], który jako gatunek obcy był notowany w Rumunii u wszystkich badanych żółwi błotnych [46].

#### 5. Infekcje wirusowe

Wirusy występujące u żółwi oraz choroby przez nie wywoływane są jeszcze słabo poznane. Na ogół infekcje wirusowe wskazuje się jako przyczynę upadków żółwi w hodowlach lub osobników wolnożyjących [12, 21, 28]. Najczęściej stwierdzana jest obecność rana-, herpes-, adeno-, papilloma- i poxwirusów [5]. W zależności od gatunku i zjadliwości szczepu wirusa, obecności niekorzystnych warunków środowiska bytowania zwierząt lub oddziaływania czynników stresogennych związanych z niewolą i zagęszczeniem, infekcje wirusowe mogą przebiegać ze słabo wyrażonymi objawami niespecyficznymi. Natomiast u padłych osobników stwierdza się zmiany anatomopatologiczne charakterystyczne dla zakażeń wirusowych o uogólnionym przebiegu [33].

U chorych żółwi nie zawsze obserwuje się objawy kliniczne, a w przypadku zakażeń wywołanych przez niektóre szczepy herpes- i adenowirusów mogą one przebiegać bezobjawowo. Zwierzęta są wówczas nosicielami i siewcami wirusów stanowiąc zagrożenie dla innych osobników. Jest to szczególnie istotne w przypadku gdy inwazyjne gatunki żółwi zostaną wprowadzone do lokalnego ekosystemu, a wraz z nimi przenoszona jest mikroflora saprofityczna i patogenna, w tym również wirusy. Nieznana jest rola, jaką mogą odgrywać żółwie obce w transmisji zakażeń wirusowych na gatunki rodzime. O możliwości zawleczenia do Europy nowych szczepów wirusa świadczy fakt identyfikacji adenowirusa u terapieny ozdobnej (*Terrapene ornata ornata*) na Węgrzech, szczepu odmiennego od tych dotychczas izolowanych od gadów, które sklasyfikowano w obrębie rodziny *Adenoviridae* [21]. Obecnie brak jest dowodów wskazujących na możliwość adaptacji wirusów zawleczonych przez egzotyczne gatunki żółwi do nowych żywicieli obecnych na kontynencie europejskim. Jednak transmisja wirusów pomiędzy

różnymi gatunkami żółwi jest możliwa, chociaż zakażenie nie zawsze prowadziło do rozwoju objawów chorobowych [37]. Niemniej jednak, obserwowano infekcje pikornawirusami przebiegające z dużą śmiertelnością żółwi śródziemnomorskich (*Testudo graeca*) i indyjskich gwiazdzistych (*Geochelone elegans*) utrzymywanych w tej samej hodowli [28].

Niewiele jest informacji dotyczących infekcji wirusowych u żółwi ozdobnych. W przypadku zwierząt odłowionych ze środowiska naturalnego stwierdzano obecność adenowirusów z prevalencją sięgającą 27,3% [17]. Nie wykazano natomiast zakażeń powodowanych przez rana- i herpeswirusy [69] pomimo, że infekcje ranawirusami są często notowane u płazów przebywających w tym samym środowisku, a żółwie czerwonolice są wrażliwe na zakażenie [2]. Inwazyjne gatunki żółwi mogą być nosicielami wirusów patogennych dla ryb, np. wirusa posocznicy krwotocznej (VHS). Tym samym przyczyniają się do zachorowań ryb przenosząc czynnik etiologiczny do miejsc, w których choroba dotychczas nie występowała [25].

## 6. Infekcje grzybicze

Grzyby należy zaliczyć do stałych elementów mikrofory środowiska. Część z nich, mimo bezsprzecznie pozytywnej funkcji, stanowić może zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Grzyby izolowane z hydrosfery mogą więc w pewnym zakresie pełnić rolę wskaźników zanieczyszczenia środowiska wodnego [18, 63]. Skład naturalnej mykobioty zdrowych żółwi i ich środowiska naturalnego zostały dotychczas stosunkowo słabo poznane [39], a jeszcze trudniej jest odnaleźć prace opisujące mikoflorę żółwi inwazyjnych odławianych ze środowiska naturalnego kraju, do którego trafiły. W związku z tym ustalenie pierwotnego źródła pochodzenia grzybów izolowanych od tych zwierząt często jest niemożliwe.

W etiopatologii infekcji grzybiczych u ludzi i zwierząt należy uwzględnić wiele czynników. Szczególną rolę odgrywają tu immunosupresja oraz predyspozycje osobnicze. Z publikacji z zakresu mikrobiologii gadów wynika, że ponad 30% schorzeń diagnozowanych u tej grupy zwierząt to grzybice [1, 55]. Informacje dotyczące mikoflory izolowanej od żółwi ograniczają się głównie do opisu przypadków, którym towarzyszyły zmiany chorobowe. Wśród różnych form grzybów obserwowanych u żółwi należy wymienić przedstawicieli rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Candida*, *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Exophiala*, *Geotrichum*, *Scedosporium* i gromady *Zygomycota*, które, podobnie jak w grzybicach u ludzi, są odpowiedzialne za zmiany narządowe i układowe [1, 6, 52]. Od żółwi izolowano również grzyby, których występowa-

nie związane jest z warunkami klimatycznymi. Łączenie infekcji grzybiczych u ludzi i zwierząt ze środowiskiem wydaje się procesem naturalnym [15, 16], jednak rola żółwi jako potencjalnego wektora chorób grzybiczych wymaga dalszych badań. Izolacje grzybów takich jak *Exophiala*, *Veronaea*, *Pleosporales*, *Ochroconiales* czy *Chaetothyriales* mogą sugerować postępującą kolonizację nowych środowisk i możliwość wystąpienia infekcji u ludzi i zwierząt [9, 44, 66]. Określenie składu mikoflory żółwi gatunków obcych jest zatem głęboko uzasadnione zarówno z powodów poznawczych, jak i epidemiologii chorób zakaźnych.

## 7. Podsumowanie

Dostępna literatura naukowa wykazuje istotne braki dotyczące wiedzy na temat bakterii, pasożytów, wirusów i grzybów występujących u inwazyjnych i obcych gatunków żółwi. Fragmentaryczne dane dotyczą zwykle określonego czynnika zakaźnego, w tym najczęściej pałeczek *Salmonella* i ich roli w wywoływaniu zakażeń człowieka. Informacje z zakresu parazytologii dotyczą głównie ekspansji geograficznej i żywicielskiej pasożytów, a infekcje wirusowe lub mikologiczne pojawiają się w opisach przypadków klinicznych. Istnieje zatem uzasadniona potrzeba kompleksowych i systematycznych badań na rolę obcych gatunków żółwi jako źródła drobnoustrojów i pasożytów istotnych w epidemiologii chorób zakaźnych i inwazyjnych zwierząt i ludzi.

### Podziękowania

Prezentowany przegląd literatury przeprowadzono w ramach projektu pt. „Inwazyjne gatunki żółwi jako źródło i wektor mikrofory patogennej dla zwierząt i ludzi” finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki na podstawie decyzji DEC-2013/11/B/NZ7/01690.

### Piśmiennictwo

1. Alekšić-Kovacević S., Ozvegy J., Krstić N., Rusvai M., Jakab C., Stanimirović Z., Becskei Z.: Skin and skeletal system lesions of european pond turtles (*Emys orbicularis*) from natural habitats. *Acta Vet. Hung.* **62**, 180–193 (2014)
2. Allender M.C., Mitchell M.A., Torres T., Sekowska J., Driskell E.A.: Pathogenicity of frog virus 3-like virus in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*) at two environmental temperatures. *J. Comp. Pathol.* **149**, 356–367 (2013)
3. Andrews R.D., Reilly J.R., Ferris D.H., Hanson L.E.: Leptospiral agglutinins in sera from Southern Illinois herpetofauna. *J. Wildl. Dis.* **1**, 55–59 (1965)
4. Angulo F.J., Harris J.R., Neil K.P., Behravesh C.B., Sotir M.J., Angulo F.J.: Recent multistate outbreaks of human *Salmonella* infections acquired from turtles: a continuing public health challenge. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 554–559 (2010)
5. Ariel E.: Viruses in reptiles. *Vet. Res.* **42**, 100 (2011)

6. Bandh S.A., Kamili A.N., Ganai B.A., Lone B.A.: Opportunistic fungi in lake water and fungal infections in associated human population in Dal Lake, Kashmir. *Microb. Pathog.* **93**, 105–110 (2016)
7. Barger M.A., Thatcher V.E., Nickol B.B.: A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: *Neoechinorhynchidae*) from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Mexico. *Comp. Parasitol.* **71**, 1–3 (2004)
8. Bertrand S., Rimhanen-Finne R., Weill F.X., Rabsch W., Thornton L., Perevoscikovs J., van Pelt W., Heck M.: *Salmonella* infections associated with reptiles: the current situation in Europe. *Euro Surveill.* **13**, 3–4 (2008)
9. Biedunkiewicz A., Schultz Ł.: Fungi of the genus *Exophiala* in tap water – potential etiological factors of phaeohyphomycoses. *Mikologia Lekarska*, **19**, 23–26 (2012)
10. Cadi A., Joly P.: Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Biodivers. Conserv.* **13**, 2511–2518 (2004)
11. Chambers D.L., Hulse A.C.: *Salmonella* serovars in the herpetofauna of Indiana County, Pennsylvania. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3771–3773 (2006)
12. Chen Z.X., Zheng J.C., Jiang Y.L.: A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle. *Virus Res.* **63**, 147–151 (1999)
13. de Sá I.V.A., Solari C.A.: *Salmonella* in Brazilian and imported pet reptiles. *Braz. J. Microbiol.* **32**, 293–297 (2001)
14. Di Ianni F., Dodi P.L., Cabassi C.S., Pelizzone I., Sala A., Cavarani S., Parmigiani E., Quintavalla F., Taddei S.: Conjunctival flora of clinically normal and diseased turtles and tortoises. *BMC Vet. Res.* **11**, 91 (2015)
15. Domiciano I.G., Domit C., Trigo C.C., de Alcantara B.K., Headley S.A., Bracarense A.P.: Phaeohyphomycoses in a free-ranging loggerhead turtle (*Caretta caretta*) from Southern Brazil. *Mycopathologia*, **178**, 123–128 (2014)
16. Donnelly K., Waltzek T.B., Wellehan J.F., Jr., Sutton D.A., Wiederhold N.P., Stacy B.A.: Phaeohyphomycosis resulting in obstructive tracheitis in three green sea turtles *Chelonia mydas* stranded along the Florida coast. *Dis. Aquat. Organ.* **113**, 257–262 (2015)
17. Doszpoly A., Wellehan J.F., Jr., Childress A.L., Tarjan Z.L., Kovacs E.R., Harrach B., Benko M.: Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoïd turtles. *Infect. Genet. Evol.* **17**, 106–112 (2013)
18. Dynowska M.: Drożdże i grzyby drożdżopodobne jako czynniki patogene oraz bioindykatory ekosystemów wodnych. Rozprawa habilitacyjna, Studia i Materiały WSP w Olsztynie, 1995
19. Ebani V.V., Fratini F., Bertelloni F., Cerri D., Tortoli E.: Isolation and identification of mycobacteria from captive reptiles. *Res. Vet. Sci.* **93**, 1136–1138 (2012)
20. Everhart B.A.: Notes on the Helminths of (Wied, 1838) of *Pseudemys scripta elegans* in Areas of Texas and Oklahoma. *Proc. of the Ocla. Acad. of Sci.* 38–43 (1957)
21. Farkas S.L., Gal J.: Adenovirus and mycoplasma infection in an ornate box turtle (*Terrapene ornata ornata*) in Hungary. *Vet. Microbiol.* **138**, 169–173 (2009)
22. Gaertner J.P., Hahn D., Rose F.L., Forstner M.R.: Detection of salmonellae in different turtle species within a headwater spring ecosystem. *J. Wildl. Dis.* **44**, 519–526 (2008)
23. Geue L., Loschner U.: *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. *Vet. Microbiol.* **84**, 79–91 (2002)
24. Głowaciński Z., Pawłowski J.: Wykaz gatunków obcych wprowadzonych i zawleczonych (w) Gatunki obce w faunie Polski, red. Z. Głowaciński, H. Okarma, J. Pawłowski, W. Solarz, Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków, 2012, s. 30–50
25. Goodwin A.E., Merry G.E.: Replication and persistence of VHSV IVb in freshwater turtles. *Dis. Aquat. Organ.* **94**, 173–177 (2011)
26. Habersack M.J., Dillaha T.A., Hagedorn C.: Common snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as a source of fecal indicator bacteria in freshwater systems. *JAWRA*, **47**, 1255–1260 (2011)
27. Hahn D., Gaertner J., Forstner M.R., Rose F.L.: High-resolution analysis of salmonellae from turtles within a headwater spring ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**, 148–155 (2007)
28. Heuser W., Pendl H., Knowles N.J., Keil G., Herbst W., Lierz M., Kaleta E.F.: Soft plastron, soft carapace with skeletal abnormality in juvenile tortoises. Histopathology and isolation of a novel picornavirus from *Testudo graeca* and *Geochelone elegans*. *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere. Heimtiere.* **42**, 310–320 (2014)
29. Hidalgo-Vila J., Diaz-Paniagua C., de Frutos-Escobar C., Jimenez-Martinez C., Perez-Santigosa N.: *Salmonella* in free living terrestrial and aquatic turtles. *Vet. Microbiol.* **119**, 311–315 (2007)
30. Hidalgo-Vila J., Diaz-Paniagua C., Perez-Santigosa N., de Frutos-Escobar C., Herrero-Herrero A.: *Salmonella* in free-living exotic and native turtles and in pet exotic turtles from SW Spain. *Res. Vet. Sci.* **85**, 449–452 (2008)
31. Hidalgo-Vila J., Diaz-Paniagua C., Ribas A., Florencio M., Perez-Santigosa N., Casanova J.C.: Helminth communities of the exotic introduced turtle, *Trachemys scripta elegans* in southwestern Spain: Transmission from native turtles. *Res. Vet. Sci.* **86**, 463–465 (2009)
32. Hidalgo-Vila J., Martinez-Silvestre A., Ribas A., Casanova J.C., Perez-Santigosa N., Diaz-Paniagua C.: Pancreatitis associated with the helminth *Serpinema microcephalus* (Nematoda: *Camallanidae*) in exotic red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *J. Wildl. Dis.* **47**, 201–205 (2011)
33. Hyatt A.D., Gould A.R., Zupanovic Z., Cunningham A.A., Hengstberger S., Whittington R.J., Kattenbelt J., Coupar B.E.: Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.* **145**, 301–331 (2000)
34. Iglesias R., Garcia-Estevez J.M., Ayres C., Acuna A., Cordero-Rivera A.: First reported outbreak of severe spirorchidiasis in *Emys orbicularis*, probably resulting from a parasite spillover event. *Dis. Aquat. Organ.* **113**, 75–80 (2015)
35. Ippen R., Zwart P.: Infectious and parasitic disease of captive reptiles and amphibians, with special emphasis on husbandry practices which prevent or promote diseases. *Rev. Sci. Tech.* **15**, 43–54 (1996)
36. Issenhuth-Jeanjean S., Roggentin P., Mikoleit M., Guibourdenche M., de Pinna E., Nair S., Fields P.I., Weill F.X. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* **165**, 526–530 (2014)
37. Johnson A.J., Pessier A.P., Jacobson E.R.: Experimental transmission and induction of ranaviral disease in Western Ornate box turtles (*Terrapene ornata ornata*) and red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Vet. Pathol.* **44**, 285–297 (2007)
38. Kirin A.D.: New data on the helminth fauna of *Emys orbicularis* (L., 1758) (*Reptilia, Emydidae*) in south Bulgaria. *C.R. Acad. Bulg. Sci.* **54**, 95–98 (2001)
39. Kurnatowski P., Rózga A., Rózga B., P.B., A.W.: Poszukiwanie grzybów potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka w wodach w Jeziora Charzykowskiego w Zaborskim Parku Krajobrazowym. *Wiad. Parazyt.* **53**, 109–115 (2007)
40. Lindtner-Knific R., Vergles-Rataj A., Vlahovic K., Zrimsek P., Dovc A.: Prevalence of antibodies against *Leptospira* sp in snakes, lizards and turtles in Slovenia. *Acta. Vet. Scand.* **55**, 65 (2013)
41. Lymbery A.J., Morine M., Kanani H.G., Beatty S.J., Morgan D.L.: Co-invaders: The effects of alien parasites on native hosts. *Int. J. Parasitol. Parasites. Wildl.* **3**, 171–177 (2014)

42. Mader D.R.: Reptile medicine and surgery. WB Saunders Company, Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto, 1996
43. Marin C., Ingesa-Capaccioni S., Gonzalez-Bodi S., Marco-Jimenez F., Vega S.: Free-living turtles are a reservoir for *Salmonella* but not for *Campylobacter*. *PLoS ONE*, **8**, e72350 (2013)
44. Matsushita A., Jilong L., Hiruma M., Kobayashi M., Matsumoto T., Ogawa H., Padhye A.A.: Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Veronea botryosa* in the People's Republic of China. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2219–2222 (2003)
45. McCoy R.H., Seidler R.J.: Potential pathogens in the environment: isolation, enumeration, and identification of seven genera of intestinal bacteria associated with small green pet turtles. *Appl. Microbiol.* **25**, 534–538 (1973)
46. Mihalca A.D., Gherman C., Ghira I., Cozma V.: Helminth parasites of reptiles (Reptilia) in Romania. *Parasitol. Res.* **101**, 491–492 (2007)
47. Mitchell J., Mc Avoy B.: Enteric bacteria in natural populations of freshwater turtles in Virginia. *Virg. J. Sci.* **41**, 233–242 (1990)
48. Moravec F., Vargas-Vazquez J.: Some endohelminths from the freshwater turtle *Trachemys scripta* from Yucatan, Mexico. *J. Nat. Hist.* **32**, 455–468 (1998)
49. Nagano N., Oana S., Nagano Y., Arakawa Y.: A severe *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B infection in a child related to a pet turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Jpn J. Infect. Dis.* **59**, 132–134 (2006)
50. Nakadai A., Kuroki T., Kato Y., Suzuki R., Yamai S., Yaginuma C., Shiotani R., Yamanouchi A., Hayashidani H.: Prevalence of *Salmonella* spp. in pet reptiles in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **67**, 97–101 (2005)
51. Oi M., Araki J., Matsumoto J., Nogami S.: Helminth fauna of a turtle species introduced in Japan, the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*). *Res. Vet. Sci.* **93**, 826–830 (2012)
52. Oros J., Calabuig P., Arencibia A., Camacho M., Jensen H.: Systemic mycosis caused by *Trichophyton* spp. in an olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*): an immunohistochemical study. *N.Z. Vet. J.* **59**, 92–95 (2011)
53. Otis V.S., Behler J.L.: The occurrence of salmonellae and *Edwardsiella* in the turtles of the New York zoological park. *J. Wildl. Dis.* **9**, 4–6 (1973)
54. Pasmans F., Van Immerseel F., Van den Broeck W., Bottreau E., Velge P., Ducatelle R., Haesebrouck F.: Interactions of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Muenchen with intestinal explants of the turtle *Trachemys scripta scripta*. *J. Comp. Pathol.* **128**, 119–126 (2003)
55. Pees M., Schmidt V., Schlomer J., Krautwald-Junghanns M.E.: Significance of the sampling points and the aerobic microbiological culture for the diagnosis of respiratory infections in reptiles. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **114**, 388–393 (2007)
56. Rataj A., Lindtner-Knific R., Vlahović K., Mavri U., Dovč A.: Parasites in pet reptiles. *Acta Vet. Scand.* **53**, 1–21 (2011)
57. Readle M., Phillips C., Goldberg T.: Prevalence of *Salmonella* in intestinal mucosal samples from free-ranging red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) in Illinois. *Herp. Con. Biol.* **5**, 208–213 (2010)
58. Readle R.A., Phillips C.A., Goldberg T.L.: Absence of cloacal shedding of *Salmonella* in wild red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Herpetol. Rev.* **39**, 427–430 (2008)
59. Rosen R., Marquardt W.C.: Ecological aspects of helminth infections in *Chrysemys scripta elegans*. *Trans. Ky. Acad. Sci.* **47**, 13–18 (1986)
60. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2011 r. w sprawie listy roślin i zwierząt gatunków obcych, które w przypadku uwolnienia do środowiska przyrodniczego mogą zagrazić gatunkom rodzimym lub siedliskom przyrodniczym. *Dz.U. 2011, Nr 210, poz. 1260*, s. 12323–12325
61. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) Nr 1143/2014 z dnia 22 października 2014 r. w sprawie działań zapobiegawczych i zaradczych w odniesieniu do wprowadzania i rozprzestrzeniania inwazyjnych gatunków obcych. *Dz.U. UE 2014, L 317*, s. 35–55
62. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2015/736 z dnia 7 maja 2015 r. zakazujące wprowadzania do Unii okazów niektórych gatunków dzikiej fauny i flory. *Dz.U. UE 2015, L117*, s. 25–44
63. Różga A., Różga B., Babski P.: Pathogenic fungi in the waters of selected lakes in the “Bory Tucholskie” National Park. *Acta Mycol.* **38**, 89–98 (2003)
64. Saelinger C.A., Lewbart G.A., Christian L.S., Lemons C.L.: Prevalence of *Salmonella* spp in cloacal, fecal, and gastrointestinal mucosal samples from wild North American turtles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **229**, 266–268 (2006)
65. Schumacher J.: Selected infectious diseases of wild reptiles and amphibians. *J. Exot. Pet. Med.* **15**, 18–24 (2006)
66. Seyedmousavi S., Guillot J., de Hoog G.S.: Phaeohyphomycoses, emerging opportunistic diseases in animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 19–35 (2013)
67. Shayegh H., Rajabloo M., Gholamhosseini A., Mootabi Alavi A., Salarian P., Zolfaghari A.: Endohelminths of European pond turtle *Emys orbicularis* in Southwest Iran. *J. Parasit. Dis.* **1–5** (2014)
68. Shen I., Shi H., Wang R., Liu D., Pang X.: An invasive species red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) carrying *Salmonella* pathogens in Hainan Island. *Mol. Pathog.* **2**, 28–32 (2011)
69. Silbernagel C., Clifford D.L., Bettaso J., Worth S., Foley J.: Prevalence of selected pathogens in western pond turtles and sympatric introduced red-eared sliders in California, USA. *Dis. Aquat. Org.* **107**, 37–47 (2013)
70. Soccini C., Ferri V.: Bacteriological screening of *Trachemys scripta elegans* and *Emys orbicularis* in the Po Plain (Italy). *Biologia (Bratisl.)*, **14**, 201–207 (2004)
71. Soldati G., Lu Z.H., Vaughan L., Polkinghorne A., Zimmermann D.R., Huder J.B., Pospischil A.: Detection of *Mycobacteria* and *Chlamydiae* in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study. *Vet. Pathol. Online*, **41**, 388–397 (2004)
72. Valdeón A., Rada V., Ayres C., Iglesias R., Longares L.A., Lázaro R.: Distribution of *Polystomoides ocellatum* (Monogenea: *Polystomatidae*) in Spain parasitizing the European pond turtle (*Emys orbicularis*). 17th European Congress of Herpetology, Veszprém, Hungary, 2015
73. Verneau O., Palacios C., Platt T., Alday M., Billard E., Allienne J.F., Basso C., Du Preez L.H.: Invasive species threat: parasite phylogenetics reveals patterns and processes of host-switching between non-native and native captive freshwater turtles. *Parasitology*, **138**, 1778–1792 (2011)
74. Yamaguti S.: The nematodes of vertebrates, part II. Interscience Publishers Inc., New York, 1961
75. Zajac M.: Występowanie i charakterystyka pałeczek *Salmonella* izolowanych od gadów egzotycznych. Praca doktorska, Państwowy Instytut Weterynaryjny – PIB, Puławy, 2015
76. Zaleśny G., Popiołek M., Jarnecki H., Łuczyński T.: *Angusticaecum holopteron* (Rudolphi, 1819) (*Nematoda*, *Ascaridoidea*): potential alien invasive species in Polish nematofauna. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Biologia i Hodowla Zwierząt*, **58**, 179–183 (2009)
77. Złotorzycka J., Lonc E., Majewska A.C., Okulewicz A., Pojmańska T., Wędrychowicz H.: Słownik parazytologiczny. Polskie Towarzystwo Parazytologiczne, Warszawa, 1998



Agnieszka Mierek-Adamska<sup>1</sup>, Wioleta Tylman-Mojżeszek<sup>1</sup>,  
Zuzanna Znajewska<sup>1</sup>, Grażyna B. Dąbrowska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło w sierpniu 2016 r.  
Zaakceptowano w listopadzie 2016 r.

1. Wstęp. 2. Historia odkryć metalotionein u bakterii. 3. Budowa i sposób wiązania jonów metali ciężkich przez bakteryjne MT. 4. Funkcje metalotionein bakteryjnych. 5. Regulacja ekspresji bakteryjnych metalotionein. 6. Obecność metalotionein u bakterii. 7. Podsumowanie

### Bacterial metallothioneins

**Abstract:** Heavy metals are found in all living organisms where, as indispensable microelements (e.g. zinc, iron, copper), are involved in endless metabolic processes. However, living organisms are also at a risk of exposure to highly toxic metals, including cadmium or lead, which do not play any physiological role. Among multiple mechanisms associated with the maintenance of micronutrient homeostasis and detoxification of unwanted metals, there is a family of low-molecular-weight, cysteine-rich proteins, able to chelate multiple metal ions i.e. the metallothioneins (MTs). They are widely distributed among *Eucaryota*, however, they have also been found in some limited *Procaroyota*, including cyanobacteria, pseudomonads and mycobacteria. These bacterial MTs differ in terms of primary structure, the number and type of metal ions they bind, as well as with regard to their physiological functions. The expression of bacterial MTs is regulated by metals via metalosensors. MTs from cyanobacteria seem to be involved in zinc homeostasis, while in *Pseudomonas* they are linked to cadmium detoxification. In *Mycobacterium*, MTs bind copper ions and may play a pivotal role in the virulence of these bacteria. The presence of MTs in other groups of bacteria remains questionable. Problems with identification of new bacterial MTs are mainly associated with low level of homology between MT amino acid sequences of different bacterial groups. Further research is needed to evaluate the physiological functions of metallothioneins in *Procaroyota*.

1. Introduction. 2. The history of discoveries of bacterial metallothioneins. 3. Structure and metal-binding properties of bacterial MTs. 4. Functions of bacterial metallothioneins. 5. Regulation of metallothionein gene expression. 6. Presence of metallothioneins in bacteria. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** cyjanobakterie, metale ciężkie, metalotioneiny, mykobakterie, *Pseudomonas*

**Key words:** cyanobacteria, heavy metals, metallothioneins, mycobacteria, *Pseudomonas*

## 1. Wstęp

Metale ciężkie, pierwiastki o gęstości większej niż 5 g/cm<sup>3</sup>, powszechnie występują w komórkach wszystkich żywych organizmów i były jednym z istotnych czynników determinujących rozwój życia na Ziemi [9]. Wśród nich cynk, miedź, żelazo, nikiel czy kobalt są mikroelementami niezbędnymi do prawidłowego przebiegu wszystkich procesów życiowych. Metale te są niezbędnymi składnikami licznych metaloprotein i tym samym pełnią istotne funkcje strukturalne, katalityczne oraz związane z wytwarzaniem energii w procesach transportu elektronów. Biorą bezpośredni udział w najważniejszych procesach biochemicznych jak fotosynteza, oddychanie wewnątrzkomórkowe, replikacja DNA czy ekspresja genów [24, 45]. Inne metale, takie jak: kadm, rtęć czy ołów według współczesnej wiedzy nie pełnią żadnych fizjologicznych funkcji, są silnie toksyczne nawet w mikromolowych stężeniach [21]. W tym kontekście niezwykle interesujący jest fakt, iż u okrzemki morskiej *Thalassiosira weissflogii* kofaktorem anhidrazy węglanowej, enzymu biorącego udział

w procesie fotosyntezy, jest nie cynk, a kadm [32]. Jak dotąd jest to jedyny przypadek, w którym wykazano udział tego rodzaju metalu w metabolizmie komórkowym. Wszystkie organizmy żywe wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających utrzymanie odpowiedniego poziomu mikroelementów (pierwiastków śladowych), gdyż w zbyt wysokich stężeniach stają się one toksyczne, a granica pomiędzy ich niedoborem a nadmiarem jest wąska. Ponadto konieczne są mechanizmy umożliwiające obronę przed metalami niepełniącymi fizjologicznych funkcji oraz mechanizmy służące do rozróżniania jonów metali ciężkich [12, 60].

U mikroorganizmów można wyróżnić sześć podstawowych rodzajów mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy metali ciężkich w komórkach: (i) zmniejszenie przepuszczalności ściany lub błony komórkowej dla metali, (ii) aktywne wypompowywanie jonów z komórki, (iii) wewnątrzkomórkowa sekwestracja poprzez białka wiążące metale, (iv) wydzielanie przez komórki substancji obniżających biodostępność metali, (v) enzymatyczne przekształcenie metalu do formy mniej toksycznej oraz (vi) adaptację komórek do

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; tel. 56 611 45 76; e-mail: browska@umk.pl

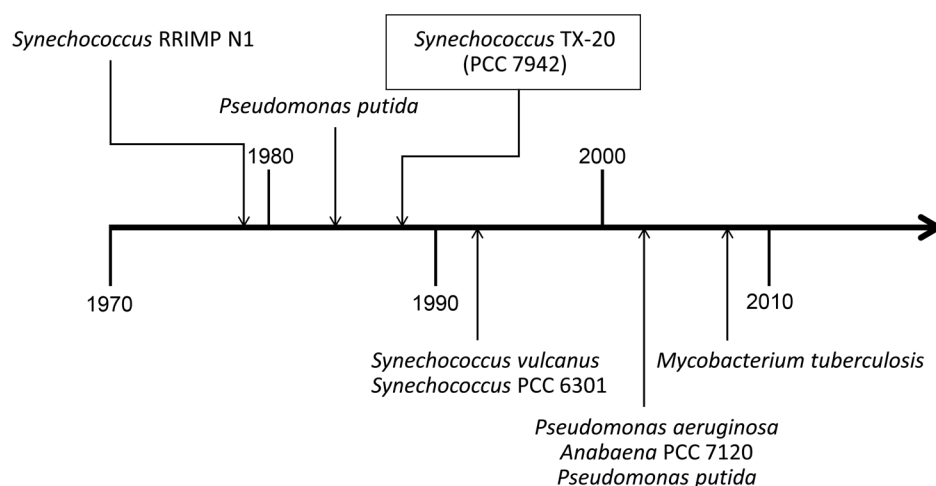
obecności toksycznych metali zwykle poprzez zmniejszenie wrażliwości komponentów komórki na metale [2]. Niezwykle istotne jest, że posiadane przez bakterie systemy utrzymania homeostazy mikroelementów czy mechanizmy obronne przed toksycznym działaniem jonów metali ciężkich wyróżniają się niemal całkowitą specyficznością w stosunku do metalu [53].

W komórkach eukariotycznych ważnym elementem metabolizmu metali są niewielkie (> 10 kDa), bogate w reszty cysteinowe białka – metalotioneiny (*metallothioneins* – MT). Reszty cysteinowe, które mogą stanowić nawet 30% wszystkich aminokwasów, poprzez swoje grupy tiolowe (-SH), wiążą różne metale ciężkie (zarówno mikroelementy, jak i metale niefizjologiczne). Białka te występują u roślin i zwierząt, a także niższych *Eucaryota*, jak grzyby i glony [10, 13, 20, 29]. Metalotioneiny pierwotnie podzielono na trzy klasy. Do klasy I należały głównie zwierzęce MT charakteryzujące się występowaniem 20 reszt cysteinowych równomiernie rozmieszczonych w całym łańcuchu aminokwasowym oraz brakiem aminokwasów aromatycznych. Klasę II stanowiły głównie MT roślinne, o mniejszej liczbie cystein zgrupowanych w domenach N- i C-końcowej oraz posiadające aminokwasy aromatyczne. Natomiast do klasy III należały syntetyzowane enzymatycznie fitochelatyny u roślin i kladystyny u grzybów [34, 48]. Wzrastająca w kolejnych latach liczba odkrytych MT spowodowała, że podział ten był niewystarczający. Nadrodzina metalotionein na podstawie układu i ilości reszt cysteinowych została podzielona na 15 rodzin, a jedną z nich stanowi rodzina MT bakteryjnych [1]. Liczne badania potwierdzają, że fizjologiczne funkcje MT u *Eucaryota* nie są ograniczone do metali ciężkich. Metalotioneiny u człowieka pełnią istotną rolę w regulacji homeostazy cynku, regulują jego dystrybucję poprzez magazynowanie, uwalnianie oraz

przekazywanie go do transporterów. MT wiążą cynk znacznie wydajniej niż inne metaloproteiny. Dla przykładu w ludzkich hepatocytach metalotioneiny wiążą nawet 5–10% całkowitego cynku [38]. Jednakże biosynteza ludzkich MT jest indukowana także przez hormony np. glukokortykoidy, wzmożony wysiłek fizyczny, mutageny, promieniowanie X i jonizujące, cytokiny oraz związki o właściwościach utleniających [54, 59]. Metalotioneiny u *Eucaryota* są zaangażowane w obronę komórek przed stresem oksydacyjnym, regulację niektórych procesów rozwojowych, także w procesy nowotworzenia i apoptozy oraz są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego [46, 47]. Mimo, że pierwsza MT zwierzęca została wyizolowana niemal 60 lat temu [39], a roślinna niemal 30 lat temu [31] ich fizjologiczne funkcje pozostają nie w pełni wyjaśnione.

## 2. Historia odkryć metalotionein u bakterii

Metalotioneiny bakteryjne pozostają najslabiej poznaną grupą metalotionein. Schemat podsumowujący historię odkryć bakteryjnych metalotionein przedstawiono na rysunku 1. Pierwszą wyizolowaną MT bakteryjną było białko z morskiej bakterii *Synechococcus* sp. RRIMP N1 [42]. Pozyskane białko charakteryzowała się znaczną zawartością cystein, a jego ekspresja była indukowana przez kadm. Ze względu na zbyt małą ilość uzyskanego białka poznanie sekwencji tej MT nie było jednak możliwe. Kilka lat później z bakterii glebowej *Pseudomonas putida*, pozyskanej z osadów ściekowych, wyizolowano trzy niewielkie białka, które podobnie jak poprzednio charakteryzowały się znaczną liczbą cystein i jonów metali. Białka te nazwano „pseudo-tioneinami”, ale ponownie nie udało się poznać ich sekwencji [25,



Rys. 1. Historia odkryć bakteryjnych metalotionein przedstawiona na osi czasu

Powyżej osi przedstawiono te gatunki bakterii, u których metalotioneiny zidentyfikowano poprzez izolację białka z komórki (ramka oznacza, że poznana została sekwencja aminokwasowa wyizolowanej MT). Poniżej osi przedstawiono gatunki bakterii, u których metalotioneiny odkryto na podstawie analizy sekwencji genomu.

26]. W roku 1988 wyizolowano kolejne białko zaliczone do rodziny metalotionein ze słodkowodnej cyjanobakterii *Synechococcus* TX-20 (*Synechococcus* PCC 7924). W tym przypadku oznaczono niemal pełną sekwencję tego białka i wykazano, że pomiędzy nim a MT eukariotycznymi istnieje bardzo niskie podobieństwo ograniczające się do dużej zawartości reszt cysteinowych i motywów, w których są one zgrupowane – Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys oraz Cys-Cys gdzie X oznacza dowolny aminokwas [44]. Wraz z rozwojem biologii molekularnej udało się zidentyfikować kolejne MT bakteryjne na podstawie analizy sekwencji genomowego DNA: *Synechococcus* PCC 6301 [23], *Theromosynechococcus vulcanus* [52], jednakże białka kodowane przez odnalezione geny nie zostały scharakteryzowane. Blindauer i wsp. [4] zidentyfikowali w genomach *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* i *Anabaena* PCC 7120 ortologi metalotionein z *Synechococcus* PCC 7924. Na podstawie zidentyfikowanych sekwencji poprzez heterologiczną ekspresję w komórkach *Escherichia coli* pozyskano białka i poddano je analizie biochemicznej. Ostatnią opisaną jak dotąd MT bakteryjną jest zidentyfikowana w *Mycobacterium tuberculosis* (prątek gruźlicy) metalotioneina nazwana MymT (*mycobacterial metallothionein*) [22].

Pierwsze metalotioneiny bakteryjne zostały wyizolowane z cyjanobakterii *Synechococcus*, dlatego zostały nazwane SmtA. Odkrycie homologicznych białek u *Pseudomonas* spowodowało zmianę nazwy na BmtA (*bacterial metallothionein*) dla całej rodziny prokariotycznych MT, a SmtA i PmtA odpowiednio dla MT *Synechococcus* i *Pseudomonas* [5]. MymT z *Mycobacterium* charakteryzowała się jednak znacznie odmienną sekwencją od poznanych wcześniej bakteryjnych metalotionein, dlatego zaproponowano oddzielenie dla nich kolejnej grupy w rodzinie tych bakteryjnych białek. Analiza sekwencji całych genomów bakteryjnych ujawniła istnienie białek zawierających nowy typ domeny

palca cynkowego – GatA. Białka te, mimo homologii części sekwencji do BmtA oraz podobnego sposobu wiązania jonów metali ciężkich nie są metalotioneinami i zostały wydzielone jako osobna rodzina prokariotycznych białek [4, 7].

### 3. Budowa i sposób wiązania jonów metali ciężkich przez bakteryjne MT

Metalotioneiny wiążą jednowartościowe jony z grupy 11 i dwuwartościowe jony z grupy 12 układu okresowego pierwiastków. Struktura przestrzenna MT jest zdeterminowana przez jony metali i tylko w obecności właściwego metalu białka te przyjmują prawidłową konformację przestrzenną. Jony dwuwartościowe są wiązane w konformacji tetraedrycznej, co oznacza, że jeden jon jest wiązany przez cztery reszty cysteinowe. Natomiast jony jednowartościowe są wiązane przez dwie lub trzy cysteiny. Cysteiny wiążące metale mogą wiązać równocześnie dwa jony (tzw. cysteiny łączące) lub tylko jeden jon metalu – cysteiny terminalne. Najlepiej poznano strukturę przestrzenną MT ssaczyc, w których stwierdzono występowanie dwóch oddzielnych domen wiążących metale: domeny  $\beta$  wiążące 3 jony dwuwartościowe przez 9 reszt cysteinowych oraz domeny  $\alpha$ , która poprzez 11 cystein wiąże 4 jony [55].

Seqwencje aminokwasowe metalotionein bakteryjnych wykazują największe zróżnicowanie spośród poznanych dotąd rodzin metalotionein. Sposób wiązania jonów metali ciężkich zależy od ilości i układu reszt cysteinowych, a zatem poszczególne bakteryjne MT mogą znacznie różnić się od siebie ilością i rodzajem wiązanych jonów. Najlepiej poznana BmtA jest SmtA z *Synechococcus* PCC 7942, która zawiera 56 aminokwasów, w tym 9 reszt cysteinowych. Ponadto w sekwencji aminokwasowej tej MT stwierdzono obecność 3 reszt histydynowych (Rys. 2A), z których dwie są



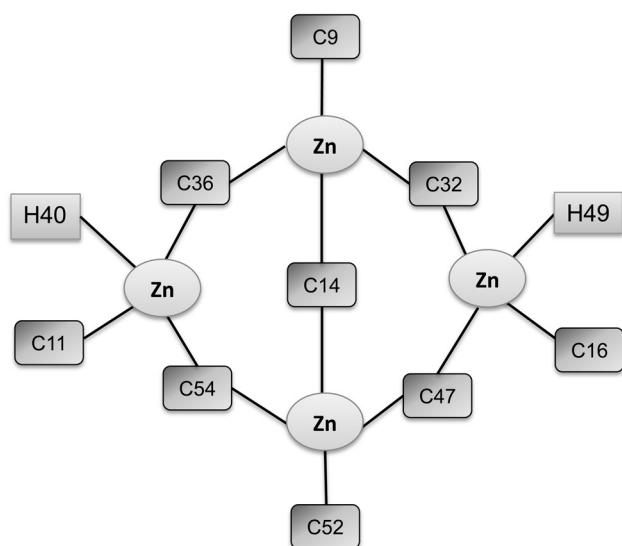
Rys. 2. Sekwencje aminokwasowe bakteryjnych metalotionein

Porównano sekwencje metalotionein reprezentujących dwie grupy: (A) BmtA (SmtA *Synechococcus* PCC 7942 oraz PmtA *Pseudomonas putida*), (B) MymT *Mycobacterium tuberculosis* oraz (C) porównanie sekwencji aminokwasowych metalotionein bakteryjnych SmtA, PmtA i MymT. Gwiazdkami oznaczono identyczne aminokwasy, kolorem jasnoszarym oznaczono reszty cysteinowe, natomiast kolorem ciemnoszarym – reszty histydynowe.

bezpośrednio zaangażowane w wiązanie metali poprzez swój pierścień imidazolowy [3]. Cechą charakterystyczną, jak sądzono początkowo, wszystkich metalotionein jest brak aminokwasów aromatycznych, w tym histydyn. Jednakże odkrycie MT u roślin, a następnie u bakterii pokazało, że brak aminokwasów aromatycznych jest cechą charakterystyczną tylko metalotionein kręgowców. Ponadto w przypadku roślinnych MT wykazano, że histydyny odgrywają znaczącą rolę nie tylko w wiązaniu metali, ale także w rozróżnianiu pomiędzy kadmem i cynkiem [33]. PmtA zbudowane są z ponad 70 aminokwasów, posiadają 10 reszt cysteinowych i zmienną liczbę reszt histydynowych – od jednej do maksymalnie trzech (Rys. 2A). Należy jednak zauważyć, że ilość i układ reszt aminokwasowych wiążących jony metali, zwłaszcza histydyn, jest znacznie mniej konserwowany ewolucyjnie u różnych gatunków *Pseudomonas* niż w przypadku SmtA u różnych gatunków cyjanobakterii [7]. Porównanie sekwencji SmtA i PmtA (Rys. 2A) pokazuje, że mimo znacznych różnic w składzie aminokwasowym porównywanych metalotionein układ i ilość reszt wiążących metale, zwłaszcza cystein, jest wysoce konserwowany.

Analiza biochemiczna tych metalotionein z wykorzystaniem spektroskopii mas, analizy elementarnej oraz magnetycznego rezonansu jądrowego wykazała, że MT *Synechococcus* PCC 7942 wiąże 4 jony cynku (lub kadmu) w klastrze –  $Zn_4Cys_9His_2$  [3, 4, 14].

Na rysunku 3 przedstawiono schemat wiązania 4 jonów  $Zn^{2+}$  przez SmtA. Ponadto wykazano, że SmtA charakteryzuje się niespotykaną wśród MT z innych organizmów cechą – jeden ze związanych atomów cynku nie podlega wymianie na dostarczany z zewnątrz



Rys. 3. Schemat wiązania jonów cynku (Zn) przez SmtA z *Synechococcus* PCC 7942

Aminokwasy wiążące jony metalu oznaczono: C – cysteina, H – histydyna, a stojąca przy literze cyfra/liczba oznacza kolejność tego aminokwasu w łańcuchu aminokwasowym, za [4, 7] (zmodyfikowane).

kadmem, podczas gdy typowo wiązania MT-jony metali są labilne i wymiana z jonów związanych z metalotioneiną na te dostarczane z zewnątrz zachodzi w czasie kilku sekund. Ta kinetyczna bierność jednego z jonów związanego z SmtA jest prawdopodobnie spowodowana przez zasłonięcie go przez aminokwasy lub pozostałe jony metali [7]. SmtA jest także zdolne do wiązania innych jonów metali w tym miedzi czy rtęci [51].

MT z *Pseudomonas* wydają się być mniej stabilne, bardziej podatne na utlenianie i agregację niż te z *Synechococcus*. Co więcej substytucja His49 SmtA przez Asp44 w PmtA (Rys. 2A) powoduje, że wiążą one tylko trzy jony cynku lub kadmu i wszystkie związane jony łatwo podlegają wymianie na inne jony metali dostarczane z zewnątrz [4, 5]. W literaturze nie ma natomiast doniesień opisujących strukturę przestrzenną jakiegokolwiek metalotioneiny z *Pseudomonas*.

MymT jest najmniejszą jak dotąd poznaną prokaryotyczną metalotioneiną, posiada 53 aminokwasy, w tym 7 reszt cysteinowych i dwie histydynowe (Rys. 2B). W przeciwieństwie do wyżej opisanych metalotionein, MymT wykazuje większe powinowactwo do miedzi niż do cynku czy kadmu. Wykazano, że białko to może wiązać od 4 do 6–7 jonów  $Cu^{2+}$ , natomiast najbardziej stabilną konformację wydaje się mieć forma z 5 jonami miedzi [22]. Porównanie sekwencji aminokwasowych SmtA, PmtA i MymT (Rys. 2C) pokazuje, że mimo bardzo niskiego stopnia homologii pomiędzy MymT a BmtA obserwuje się podobieństwo motywów zawierających reszty cysteinowe.

#### 4. Funkcje metalotionein bakteryjnych

Wszystkie wyizolowane w latach 80. ubiegłego wieku MT bakteryjne, a więc z *Synechococcus* RRIMP N1, TX-20 czy *P. putida* pochodziły z bakterii zaadaptowanych do życia w środowisku zawierającym znaczne stężenia kadmu [25, 42, 44]. SmtA pojawiało się w komórkach bakteryjnych tylko w odpowiedzi na obecności kadmu i cynku, ale nie na obecności miedzi [43]. Jednakże poziom transkryptów genu *smtA* *Synechococcus* PCC 7924 wzrastał w obecności wielu jonów metali: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb czy Zn. Ponadto gen reporterowy *lacZ* umieszczony pod kontrolą promotora genu *smtA* ulegał ekspresji indukowanej przez różne metale, jednakże najsilniejszym induktorem był cynk. Mutanty *Synechococcus* pozbawione genu *smtA* są wyraźnie nadwrażliwe na cynk, podczas gdy na kadmu tylko w niewielkim stopniu [58]. Nadekspresja *smtA* w komórkach *E. coli* prowadzi natomiast do zwiększonej akumulacji cynku i miedzi, ale nie kadmu [51]. Co ciekawe, zwiększoną liczbę kopii genu *smtA* obserwowano w szczepach *Synechococcus* PCC 6301 charakteryzujących się zwiększoną tolerancją na kadmu [23]. Przedstawione

wyniki sugerują, że SmtA u cyjanobakterii jest zaangażowane w utrzymanie homeostazy cynku, jednakże nie można wykluczyć ich roli również w detoksyfikacji kadmu [7]. Znacznie mniej wiadomo na temat fizjologicznych funkcji MT u *Pseudomonas*. Poziom PmtA u *P. putida* i *P. aeruginosa* wzrastał w obecności kadmu i miedzi [16], a u *P. aeruginosa* także w odpowiedzi na ołów [41] co może sugerować udział metalotionein *Pseudomonas* w obronie komórek przed toksycznym działaniem metali ciężkich.

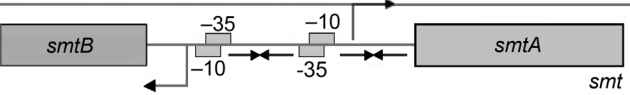

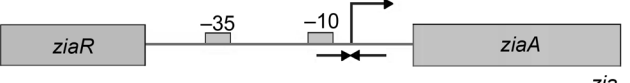


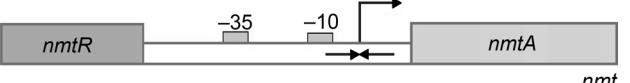
Odmienna budowa MymT i specyficzność w stosunku do związanych metali odzwierciedla zupełnie inne fizjologiczne funkcje MT u mykobakterii. Białko to zostało odkryte w czasie poszukiwania, które geny *M. tuberculosis* nadają jej oporność na jeden z testowanych leków przeciwgruźliczych. Ekspresja genu *mymT* jest indukowana przez różne metale ciężkie, ale jej najsilniejszym induktorem jest miedź. Ponadto wzrost poziomu mRNA obserwowano w odpowiedzi na stres oksydacyjny, reaktywne formy azotu czy uszkodzenie ściany komórkowej bakterii. Mutanty pozbawione genu *mymT* są bardziej wrażliwe na miedź, ale nie na inne metale ciężkie [22].

Prątki gruźlicy większą część cyklu życiowego bytują w fagosomach makrofagów, w których w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne dochodzi do nagromadzenia się jonów miedzi. Sposób toksycznego działania tych jonów na *M. tuberculosis* pozostaje niejasny, możliwe jest działanie bezpośrednie lub pośrednie na przykład poprzez generowanie toksycznych ilości reaktywnych form tlenu. Wirulencja *M. tuberculosis* jest związana z opornością na miedź i posiada ona przynajmniej trzy niezależne szlaki umożliwiające obronę przed toksycznym działaniem tego pierwiastka: (i) aktywne wypompowywanie jonów miedzi poza komórkę, (ii) oksydazy multimiedziowe oraz (iii) białka chelatujące miedź w cytoplazmie, w tym metalotioneiny. Współdziałanie tych mechanizmów wydaje się być niezbędne w osiągnięciu pełnej zjadliwości przez prątki gruźlicy [15, 50]. Operon *mymT* wchodzi w skład regulonu związanego z opornością komórek na miedź kontrolowanego przez represor RicR, który ponadto reguluje ekspresję wielu innych genów obecnych tylko w patogennych szczepach *Mycobacterium*. Sugeruje to, że metalotioneina MymT może mieć bezpośredni związek z wirulencją tej bakterii [18]. Potwierdza to również analiza dostępnych sekwencji genomów mykobakterii, która wykazała brak genów kodujących MymT u szczepów mniej lub całkowicie niewirulentnych [7]. Jednakże, mutanty *M. tuberculosis* pozbawione *mymT* nie są mniej zjadliwe dla myszy niż szczepy dzikie [22]. Jest wysoce prawdopodobne, że całkowita utrata wirulencji jest możliwa tylko kiedy bakteria zostanie pozbawiona wszystkich mechanizmów zaangażowanych w detoksyfikację miedzi [18].

BmtA i MymT różnią się znacznie nie tylko sekwencją, ale także wydają się pełnić bardzo odmienne fizjologiczne funkcje związane bezpośrednio z adaptacją komórek bakteryjnych do specyficznych nisz środowiskowych jakie zajmują. Metalotioneiny bakteryjne są słabo konserwowane ewolucyjnie, a tym samym jest bardzo prawdopodobne, że ich fizjologiczne funkcje są bardzo różne w poszczególnych grupach bakterii [6].

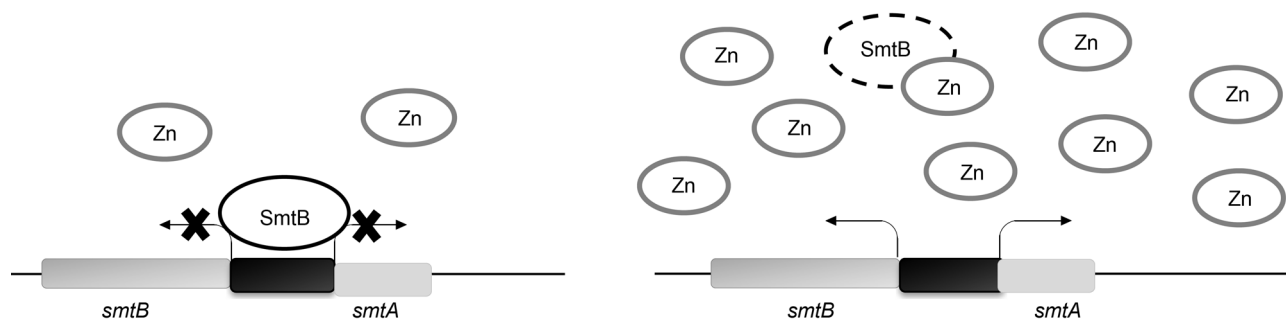
## 5. Regulacja ekspresji bakteryjnych metalotionein

Szacuje się, że około 1/3 wszystkich białek wymaga do swojej aktywności jonów metali. W toku ewolucji pojawiła się specyficzność białko-metal, oznaczająca, że tylko w obecności konkretnego metalu dane białko może prawidłowo funkcjonować. Aktualne pozostaje pytanie w jaki sposób poszczególne białka rozróżniają jony metali i są zdolne do preferencyjnego wychwytywania właściwego jonu. Jest to niezwykle istotne zagadnienie zwłaszcza, że poszczególne metale akumulowane są w komórkach bakteryjnych w bardzo różnych ilościach, a ponadto niektóre metale łatwiej niż inne wiążą się z białkami zgodnie z tzw. serią Irvinga-Williams'a. Zgodnie z nią najmniejszą stabilnością charakteryzują się kompleksy białek z jonami  $Mn^{2+}$  czy  $Fe^{2+}$ , większą z  $Cu^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , natomiast najsilniej białka wiążą jony  $Cu^+$ ,  $Fe^{3+}$  oraz toksycznych metali jak kadm czy rtęć [60]. Jednym z mechanizmów zapewniającym wiązanie odpowiednich metali przez odpowiednie białka jest ograniczanie ilości wolnych jonów metali w komórce. Badania potwierdzają, że to nie metale ciężkie rywalizują ze sobą o wiązanie z białkiem, ale to białka między sobą rywalizują o konkretny metal. Ponadto, komórki posiadają liczne czynniki transkrypcyjne zależne od jonów metali, które regulują ekspresję białek zaangażowanych w metabolizm komórkowy metali ciężkich. Czynniki te nazywane metalosensarami (metaloregulatorami) kontrolują ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za pobieranie, magazynowanie lub wypompowywanie jonów [19]. Związanie metalu przez metalosensor powoduje zmiany w jego konformacji, które umożliwiają interakcje z DNA i tym samym aktywację ekspresji genu przez niego regulowanego (aktywatory transkrypcji) lub przeciwnie, po związaniu metalu metalosensor staje się nieaktywny i transkrypcja genu przez niego kontrolowanego zostaje zahamowana (represor transkrypcji). W komórkach bakteryjnych zidentyfikowano siedem głównych rodzin metaloregulatorów, których nazwy pochodzą od pierwszych zidentyfikowanych przedstawicieli: ArsR/SmtB, MerR, CsoR/RcnF, CopY, Fur, DtxR, NikR [37]. Do rodziny ArsR/SmtB zalicza się represory transkrypcji regulowane przez różne jedno- i dwuwartościowe jony metali ciężkich, które pochodzą od wspólnego przodka,

Operon	Specyficzność	Białko represorowe	Białko oporności	Funkcja
	Zn(II), Co(II), Cd(II)	SmtB	SmtA	metalotioneina
	As(III), Sb(III)	ArsR (ArsD?)	(ArsA) ArsB ArsC	ATPaza typu P kanał błonowy reduktaza arsenu
	Zn(II)	ZiaR	ZiaA	ATPaza typu P
	Cd(II), Pb(II), Bi(III), Zn(II)	CadC	CadA	ATPaza typu P
	Zn(II), Co(II)	CzrA	CzrB	kanał błonowy
	Ni(II), Co(III)	NmtR	NmtA	ATPaza typu P

Rys. 4. Operony, które podlegają kontroli transkrypcyjnej białek represorowych z rodziny ArsR/SmtB

Na schemacie podano również od jakiego metalu zależy dany represor oraz ekspresja jakich białek jest przez niego regulowana [8], zmodyfikowane.

Rys. 5. Schemat przedstawiający mechanizm regulacji operonu *smt* przez białko SmtB w zależności od stężenia jonów  $Zn^{2+}$  w komórce bakteryjnej

ale w wyniku ewolucji uzyskały odmienną specyficzność w stosunku do metali (Rys. 4). ArsR jest zależnym od arsenu/antymonu represorem operonu *ars* występującego np. u *E. coli*. SmtB jest natomiast zależnym od cynku represorem transkrypcji genu metalotioneiny *smtA* u *Synechococcus* [8, 11].

Gen kodujący SmtA u *Synechococcus* jest oddzielony od genu *smtB* przez region pełniący funkcje promotora-operatora długości około 100 pz. Mutanty pozbawione genu *smtB* cechują się wysoką ekspresją *smtA* nawet przy braku cynku co potwierdza, że SmtB jest zależnym od cynku represorem transkrypcji genu *smtA* [28, 40].

W obrębie sekwencji oddzielającej geny operonu *smt* występują cztery miejsca, w których może dochodzić do interakcji SmtB z DNA. Przy niskim stężeniu SmtB wiąże się jako monomer do jednego z dwóch miejsc (S1 i S2) położonych bezpośrednio po 5' stronie genu *smtA*. Kiedy stężenie tego białka w komórce wzrasta powstają dimery, które wiążą się równocześnie do obu tych miejsc [17] i dopiero wówczas dochodzi do zahamowania transkrypcji *smtA* [57] (Rys. 5). Wiązanie SmtB do dwóch pozostałych miejsc (S3 i S4) w DNA zachodzi tylko przy bardzo wysokich stężeniach tego białka. Cynk hamuje dimeryzację tego białka [17] lub

zmienia jego konformację przestrzenną, a tym samym uniemożliwia jego interakcje z DNA i aktywuje ekspresję *smtA* [49]. Związanie wolnych jonów cynku przez SmtA umożliwia ponowne interakcje monomerów SmtB i wyciszenie ekspresji *smtA*. SmtB jest także regulatorem własnej transkrypcji prawdopodobnie poprzez wiązanie się z miejscami S3 i S4. Ponadto jest możliwe, że istnieje dodatkowy mechanizm kontroli transkrypcji *smtA*, gdyż nawet przy braku SmtB obserwowano wzrost ekspresji metalotioneiny *smtA* w odpowiedzi na metale ciężkie [6].

U *Synechocystis* PCC 6803, w genomie której nie znaleziono sekwencji kodującej białko homologiczne do SmtA, występuje operon *zia* (Rys. 4). W skład operonu wchodzi, podobnie jak w przypadku operonu *smt*, gen kodujący białko represorowe ZiaR będący ortologiem SmtB oraz gen kodujący pompę ZiaA odpowiedzialną za aktywne usuwanie jonów cynku z cytoplazmy do przestrzeni periplazmatycznej [56]. U innej słodkowodnej cyjanobakterii *Oscillatoria brevis* stwierdzono obecność zarówno metalotioneiny, jak i pompy homologicznej do ZiaA – Bxa1. Ekspresja obu genów jest indukowana przez jony metali ciężkich, a ich nadekspresja w *E. coli* daje zwiększoną oporność transgenicznych bakterii na cynk i kadm. Wydaje się, że Bxa1 odpowiada za szybką odpowiedź komórki na metale, podczas gdy SmtA raczej za utrzymanie długotrwałej homeostazy [36]. Ekspresja obu tych genów jest regulowana przez metalosensor należący do rodziny ArsA/SmtB – BxmR [35]. Potwierdza to, że nawet u blisko spokrewnionych mikroorganizmów mogą istnieć bardzo zróżnicowane mechanizmy utrzymywania homeostazy metali [6]. Białka homologiczne do SmtB zidentyfikowano również u gatunków bardziej odległych ewolucyjnie np. *Staphylococcus aureus*. Białko CzrA odpowiada za regulację operonu *czrAB* odpowiedzialnego za transport cynku przez błonę komórkową [30].

Za kontrolę ekspresji *mymT* u *M. tuberculosis* odpowiada represor RicR należący, do innej niż SmtB, rodziny metalosensorów CsoR/RcnF. Represor ten kontroluje regulon składający się z 5 operonów związanych z homeostazą miedzi. U *M. tuberculosis* występuje też inny czynnik transkrypcyjny zależny od miedzi – CsoR, a powody występowania dwóch represorów transkrypcji z tej samej rodziny pozostają niejasne [27]. Przy wysokim stężeniu miedzi RicR nie wiąże się z DNA i tym samym następuje indukcja ekspresji *mymT* [18].

## 6. Obecność metalotionein u bakterii

Analiza dotychczasowych doniesień dotyczących metalotionein bakteryjnych mogłaby skłonić do stwierdzenia, że białka te nie są szeroko rozpowszechnione u bakterii. Jednakże odkrycie MymT sugeruje raczej,

że sekwencje bakteryjnych metalotionein nie są ewolucyjnie konserwowane, a brak homologii pomiędzy metalotioneinami różnych grup bakterii może powodować problemy z odnajdowaniem genów je kodujących w nowo sekwencjonowanych genomach. Poza niskim stopniem podobieństwa także niewielkie rozmiary i niska złożoność MT mogą być przyczyną pomijania ich sekwencji kodujących w czasie automatycznych analiz rozrastających się baz danych bakteryjnych sekwencji DNA. Wiele gatunków bakterii zawiera więcej niż jedną kopię genu metalotioneiny w genomie, a u niektórych występują dodatkowe kopie tego genu zlokalizowane także w plazmidzie [7].

W wyniku przeszukania bazy sekwencji aminokwasowych zdeponowanych w bazie NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)) za pomocą hasła: „metallothionein bacteria” otrzymuje się w sumie 4848 wyniki (maj 2016). Interesujący jest fakt, że metalotioneiny są w ten sposób znajdowane także u innych bakterii niż dotychczas w tym u *Proteobacteria* czy *Actinobacteria*. Jednakże analiza otrzymanych trafień ujawnia, że wiele z nich jest fałszywych. Skrót SmtA jest mylony z tym oznaczającym metylotransferazę (MT) zależną od S-adenozylu-L-metioniny (SAM), a tym samym znakomita część otrzymanych trafień mimo, że opisanych jako metalotioneina SmtA zawiera sekwencję metylotransferazy a nie metalotioneiny. Ponadto, w wielu przypadkach otrzymana sekwencja nie spełnia w pełni wymagań stawianych metalotioneinom np. występują tylko 4 reszty cysteinowe. Podobnie jest w przypadku innych dostępnych baz danych np. bazy UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) zawierających sekwencje aminokwasowe. Tego rodzaju analiza baz danych nie daje odpowiedzi na pytanie o powszechność metalotionein u bakterii. Jednakże przeszukanie baz danych z wykorzystaniem znanych sekwencji nukleotydowych lub aminokwasowych metalotionein bakteryjnych również nie da nam pełnego obrazu dystrybucji tych białek u bakterii ze względu na możliwy brak homologii pomiędzy znanymi MT a tymi, które mogą pozostawać nieodkryte.

Zasadne też jest pytanie, dlaczego u bakterii pojawiły się metalotioneiny skoro u tych organizmów za utrzymanie odpowiedniego poziomu jonów metali ciężkich w komórce odpowiadają przede wszystkim transportery aktywnie usuwające te jony poza komórkę. Być może funkcje metalotionein u bakterii to coś więcej niż utrzymanie homeostazy mikroelementów czy detoksyfikacja toksycznych metali. W przypadku *Synechococcus* metalotioneiny mogą pełnić rolę rezerwuaru cynku na wypadek jego braku w środowisku. Natomiast u *M. tuberculosis* istnienie wielu ścieżek obrony przed toksycznym stężeniem miedzi występującym w makrofagach może sugerować bardziej złożone fizjologiczne funkcje MymT, niż tylko chelatacja toksycznych jonów miedzi [7].

## 7. Podsumowanie

Utrzymanie odpowiedniego stężenia metali ciężkich u wszystkich żywych organizmów obejmuje szereg procesów pozwalających na ściśle kontrolowanie stężenia mikroelementów i obronę przed toksycznymi metalami. Metalotioneiny to białka bogate w reszty cysteinowe, powszechne u *Eucaryota*, ale występujące także u niektórych *Prokaryota*. Są chelatorami jonów metali ciężkich i pełnią bardzo ważną rolę zarówno w homeostazie mikroelementów jak i detoksyfikacji metali niepełniących fizjologicznych funkcji. U bakterii jak dotąd metalotioneiny zostały zidentyfikowane tylko u cyjnobakterii, bakterii z rodzaju *Pseudomonas* oraz mykobakterii. Zidentyfikowane MT bakteryjne różnią się budową, rodzajem wiązanych jonów metali ciężkich i prawdopodobnie pełnią odmienne fizjologiczne funkcje.

Metalotioneiny bakteryjne stanowią bardzo interesującą rodzinę bakteryjnych białek, pozostają jednak słabo scharakteryzowane. Ze względu na niski stopień homologii sekwencji aminokwasowej pomiędzy MT bakterii identyfikacja nowych członków tej rodziny białek jest utrudniona. Konieczne są dalsze badania, które pozwolą stwierdzić czy MT są powszechnymi białkami u bakterii oraz umożliwią pełne poznanie ich budowy, sposobu wiązania jonów, a przede wszystkim fizjologicznych funkcji. Wraz z rozwojem badań i z zastosowaniem nowoczesnych technik, istnieje nadzieja, że możliwe będzie jeszcze dokładniejsze poznanie ich mechanizmu działania i ustaleniu pełnionych przez nie funkcji oraz wyizolowanie kolejnych metalotionein z mikroorganizmów.

W przyszłości wiedza ta może mieć znaczący wpływ m.in. na poznanie mechanizmów wiązania i regulacji jonów pierwiastków śladowych przez bakterie patogene, a tym samym możliwość pozyskiwania nowych terapeutyków oraz rozwój technik bioremediacji wód, gleby czy osadów z metali ciężkich. Dzięki poznaniu pełnionych przez te białka funkcji, możliwe będzie wykorzystanie ich w przemyśle biotechnologicznym, a wraz z postępem nauk biologicznych i kolejnym odkryciom, możliwe będzie zastosowanie MT na szerszą skalę w medycynie.

### Podziękowania

Praca została sfinansowana z grantu UMK nr 2580-B.

### Piśmiennictwo

1. Binz P.A., Kägi J.H.R.: Metallothionein: molecular evolution and classification (w) Metallothionein IV, red. Klaassen C.D. Springer, Basel 1999, s. 7–13
2. Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W.: Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 198–207 (2000)
3. Blindauer C.A., Harrison M.D., Parkinson J.A., Robinson A.K., Cavet J.S., Robinson N.J., Sadler P.J.: A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9593–9598 (2001)
4. Blindauer C.A., Harrison M.D., Robinson A.K., Parkinson J.A., Bowness P.W., Sadler P.J., Robinson N.J.: Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.* **45**, 1421–1432 (2002)
5. Blindauer C.A., Sadler P.J.: How to hide zinc in a small protein. *Acc. Chem. Res.* **38**, 62–69 (2005)
6. Blindauer C.A.: Bacterial metallothioneins (w) Metallothioneins and related chelators. Metal ions in life science vol. 5, red. Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2009, s. 51–81
7. Blindauer C.A.: Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 1011–1024 (2011)
8. Busenlehner L.S., Pennella M.A., Giedroc D.P.: The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 131–143 (2003)
9. Capdevila M., Atrian S.: Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 977–989 (2011)
10. Capdevila M., Bofill R., Palacios Ò., Atrian S.: State-of-art of metallothioneins at the beginning of the 21<sup>st</sup> century. *Coord. Chem. Rev.* **256**, 46–62 (2012)
11. Cavet J.S., Meng W., Pennella M.A., Appelhoff R.J., Giedroc D.P., Robinson N.J.: A nickel-cobalt sensing ArsR-SmtB family repressor: contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity. *J. Biol. Chem.* **277**, 38441–38448 (2002)
12. Clemens S.: Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, **88**, 1707–1719 (2006)
13. Dąbrowska G., Mierek-Adamska A., Goc A.: Characteristics of *Brassica napus* L. metallothionein genes: expression in organs and during seed germination. *Austr. J. Crops Sci.* **7**, 1324–1332 (2013)
14. Daniels M.J., Turner-Cavet J.S., Selkirk R., Sun H., Parkinson J.A., Sadler P.J., Robinson N.J.: Coordination of Zn<sup>2+</sup> (and Cd<sup>2+</sup>) by prokaryotic metallothionein. Involvement of His-imidazole. *J. Biol. Chem.* **273**, 22957–22961 (1998)
15. Darwin K.H.: *Mycobacterium tuberculosis* and copper: a newly appreciated defense against an old foe? *J. Biol. Chem.* **290**, 18962–18966 (2015)
16. Enshaei M., Khanafari A., Sepahey A.A.: Metallothionein induction in two species of *Pseudomonas* exposed to cadmium and copper contamination. *Iran J. Environ. Health Sci. Eng.* **7**, 287–298 (2010)
17. Erbe J.L., Taylor K.B., Hall L.M.: Metalloregulation of the cyanobacterial smt locus: identification of SmtB binding sites and direct interaction with metals. *Nucl. Acids Res.* **23**, 2472–2478 (1995)
18. Festa R.A., Jones M.B., Butler-Wu S., Sinsimer D., Gerads R., Bishai W.R., Peterson S.N., Darwin K.H.: A novel copper-responsive regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **79**, 133–148 (2011)
19. Foster A.W., Robinson N.J.: Promiscuity and preferences of metallothioneins: the cell rules. *BMC Biol.* **9**, 25–28 (2011)
20. Freisinger E.: Plant MTs – long neglected members of the metallothionein superfamily. *Dalton Trans.* **47**, 6663–6675 (2008)
21. Godt J., Scheidig F., Grosse-Siestrup C., Esche V., Brandenburg P., Reich A., Gronberg D.A.: The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* **1**, 22 (2006)



22. Gold B., Deng H., Bryk R., Vargas D., Eliezer D., Roberts J., Jiang X., Nathan C.: Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacterial. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 609–616 (2008)
23. Gupta A., Whitton B.A., Morby A.P., Huckle J.W., Robinson N.J.: Amplification and rearrangement of a prokaryotic metallothionein locus *smt* in *Synechococcus* PCC 6301 selected for tolerance to cadmium. *Proc. Biol. Sci.* **248**, 273–281 (1992)
24. Hänsch R., Mendel R.R.: Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 259–266 (2009)
25. Higham D.R., Sadler P.J., Scawen M.D.: Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science*, **225**, 1043–1046 (1984)
26. Higham D.P., Sadler P.J., Scawen M.D.: Cadmium-binding proteins in *Pseudomonas putida*: pseudothioneins. *Environ. Health Persp.* **65**, 5–11 (1986)
27. Higgins K.A., Giedroc D.: Insights into protein allostery in the CsoR/RcnR family of transcriptional repressors. *Chem. Lett.* **43**, 20–25 (2014)
28. Huckle J.W., Morby A.P., Turner J.S., Robinson N.J.: Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol. Microbiol.* **7**, 177–187 (1993)
29. Koszucka A.M., Dąbrowska G.: Roślinne metalotioneiny. *Post. Biol. Kom.* **33**, 285–302 (2006)
30. Kuroda M., Hayashi H., Ohta T.: Chromosome-determined zinc-responsible operon *czt* in *Staphylococcus aureus* strain 912. *Microbiol. Immunol.* **43**, 115–125 (1999)
31. Lane B., Kajojka R., Kennedy R.: The wheat-germ E<sub>c</sub> protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochem. Cell Biol.* **65**, 1001–1005 (1987)
32. Lane T.W., Saito M.A., George G.N., Pickering I.J., Prince R.C., Morel F.M.M.: A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, **435**, 42 (2005)
33. Leszczyszyn O.I., White C.R.J., Blindauer C.A.: The isolated Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> site in E<sub>c</sub> metallothionein mediates metal-specific protein folding. *Mol. Bio. Syst.* **6**, 1592–1603 (2010)
34. Leszczyszyn O.I., Imam H.T., Blindauer C.A.: Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. *Metallomics*, **5**, 1146–1169 (2013)
35. Liu T., Nakashima S., Hirose K., Shibasaka M., Katsuhara M., Ezaki B., Giedroc P.D., Kasamo K.: A novel cyanobacterial SmtB/ArsR family repressor regulates the expression of a CPX-ATPase and a metallothionein in response to both Cu(I)/Ag(I) and Zn(II)/Cd(II). *J. Biol. Chem.* **279**, 17810–17818 (2004)
36. Liu T., Nakashima S., Hirose K., Uemura Y., Shibasaka M., Katsuhara M., Kasamo K.: A metallothionein and CPX-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *FEBS Lett.* **542**, 159–163 (2003)
37. Ma Z., Jacobsen F.E., Giedroc D.P.: Metal transporters and metal sensors: how coordination chemistry controls bacterial metal homeostasis. *Chem. Rev.* **109**, 4644–4681 (2009)
38. Maret W., Sandstead H.: Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **20**, 3–20 (2005)
39. Margoshes M., Vallee B.L.: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813–4814 (1957)
40. Morby A.P., Turner J.S., Huckle J.W., Robinson N.J.: SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. *Nucl. Acids Res.* **21**, 921–925 (1993)
41. Naik M.M., Pandey A., Dubey S.K.: *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1 from Mandovi estuary possesses metallothionein to alleviate lead toxicity and promotes plant growth. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **79**, 129–133 (2012)
42. Olafson R.W., Abel K., Sim R.G.: Prokaryotic metallothionein: preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 36–43 (1979)
43. Olafson R.W., Loya S., Sim R.G.: Physiological parameters of prokaryotic metallothionein induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1495–1503 (1980)
44. Olafson R.W., McCubbin W.D., Kay C.M.: Primary- and secondary- structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. cyanobacterium. *Biochem. J.* **251**, 691–699 (1988)
45. Palmer C.M., Guerinot M.L.: Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 333–340 (2009)
46. Pedersen M., Larsen A., Stoltenberg M., Penkova M.: Cell death in the injured brain: Roles of metallothioneins. *Prog. Histochem. Cytochem.* **44**, 1–27 (2009)
47. Pedersen M., Larsen A., Stoltenberg M., Penkova M.: The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog. Histochem. Cytochem.* **44**, 29–64 (2009)
48. Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C., Jackson P.J.: Plant metallothioneins. *Biochem. J.* **295**, 1–10 (1993)
49. Robinson N.J., Whitehall S.K., Cavet J.S.: Microbial metallothioneins. *Adv. Microb. Physiol.* **44**, 183–213 (2001)
50. Rowland J.L., Niederweis M.: Resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. *Tuberculosis*, **92**, 202–210 (2012)
51. Shi J., Lindsay W.P., Huckle J.W., Morby A.P., Robinson N.J.: Cyanobacterial metallothionein gene expressed in *Escherichia coli*. Metal-binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett.* **2–3**, 159–163 (1992)
52. Shimizu T., Hiyama T., Ikeuchi M., Inoue Y.: Nucleotide sequence of a metallothionein gene of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Plant Mol. Biol.* **20**, 565–567 (1992)
53. Silver S., Phung L.T.: Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 753–789 (1996)
54. Stepkowska I.M.: Właściwości biologiczne metalotionein i ich udział w procesach oksydoredukcyjnych w komórkach, ze szczególnym uwzględnieniem ośrodkowego układu nerwowego człowieka. *Post. Biol. Kom.* **37**, 869–885 (2010)
55. Sutherland D.E., Stillman M.J.: The “magic numbers” of metallothionein. *Metallomics*, **3**, 444–463 (2011)
56. Thelwell C., Robinson N.J., Turner-Cavet J.S.: An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10728–10733 (1998)
57. Turner J.S., Glands P.D., Samson A.C.R., Robinson N.J.: Zn<sup>2+</sup>-Sensing by the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: different motifs mediate metal-induced protein-DNA dissociation. *Nucl. Acids Res.* **24**, 3714–3721 (1996)
58. Turner J.S., Morby A.P., Whitton B.A., Gupta A., Robinson N.J.: Construction and characterisation of Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *J. Biol. Chem.* **268**, 4494–4498 (1993)
59. Vašák M.: Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19**, 13–17 (2005)
60. Waldron K.J., Robinson N.J.: How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 25–35 (2009)

1. Wstęp. 2. Czynniki zwiększające ryzyko infekcji *Lactobacillus* sp. 3. Identyfikacja *Lactobacillus* sp. 4. Chorobotwórczość *Lactobacillus* sp. 5. Podsumowanie

#### Pathogenicity of *Lactobacillus* sp. – risk factors, identification, antibiotic resistance

**Abstract:** Lactobacilli are found in the mucous membrane of the mouth, in the gastrointestinal tract (GIT) and in the genitourinary tract. It is known that lactobacilli have a beneficial effect on our health and are used in the production of fermented milk, yoghurts, cheese, and probiotics. However, in this article I show that lactic acid bacteria also cause many diseases. Lactobacilli produce lactic acid which acidifies the environment. There are some factors increasing the risk of infection caused by lactobacilli, such as neutropenia in immunocompromised patients and certain underlying diseases, especially diabetes. Also, lactobacilli have a natural resistance to some antibiotics, especially vancomycin. The identification of lactobacilli can be very difficult due to the number of species, subspecies and genotypic or phenotypic traits. The most advanced procedures are molecular DNA-based techniques. Conventional biochemical tests can be also used to determine some differences. Lactobacilli infection can affect both a single organ and the whole organism, causing for example lactobacillemia. The main disease caused by lactobacilli is endocarditis.

1. Introduction. 2. Risk factors. 3. Identification. 4. Pathogenicity. 5. Conclusions

**Słowa kluczowe:** chorobotwórczość, diagnostyka, *Lactobacillus*

**Key words:** diagnostics, *Lactobacillus*, pathogenicity

## 1. Wstęp

Rodzaj *Lactobacillus*, wchodzący w skład grupy bakterii kwasu mlekowego (LAB), jest niejednorodną pod względem molekularnym [19] grupą mikrobiologiczną. Dany rodzaj prezentuje także wiele różnic z punktu widzenia właściwości fenotypowych, konfiguracji kwasu mlekowego czy fermentacji różnych węglowodanów i alkoholi (m.in. ksylozy czy mannitolu) [19]. LAB zawiera około 135 gatunków i 27 podgatunków [4] izolowanych z ludzkich i zwierzęcych błon śluzowych, zwłaszcza w jamie ustnej i jelicie. Pałeczki *Lactobacillus* sp. należą do grupy bakterii Gram-dodatnich, względnie lub ściśle beztlenowych, nieprzetrwalnikujących oraz często sprawiających trudność w identyfikacji [7]. Kolonizują błonę śluzową jamy ustnej, przewód pokarmowy i układ moczowo-płciowy, ale nie są składnikami flory skóry ludzkiej [3, 4]. Fermentują glukozę oraz należą do bakterii katalazo-ujemnych [1]. Charakteryzuje je brak ruchliwości i morfologiczne podobieństwo do innych laseczek Gram-dodatnich typu *Corynebacterium* czy *Clostridium*. Najczęściej opisywanym gatunkiem, wywołującym zakażenia oportunistyczne u ludzi, był gatunek *L. casei* [4].

Pałeczki *Lactobacillus* sp. wytwarzają m.in. kwas mlekowy, co skutkuje obniżeniem pH środowiska, w którym się znajdują. W przemyśle do produkcji m.in. mleka fer-

mentowanego, jogurtów i produktów farmaceutycznych używa się wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* [2]. Przemysł serowarski korzysta z gatunków mezofilnych typu *L. casei*, *L. paracasei* czy *L. plantarum* [4]. Rola bakterii kwasu mlekowego związana jest z ich umiejętnością rozkładu białek i tłuszczów chociaż samo działanie tychże pałeczek w ludzkim przewodzie pokarmowym nie jest jeszcze szczególnie poznane. Prawdopodobnie w ludzkim układzie pokarmowym LAB realizują 4 różne ważne dla gospodarza funkcje: produkcja substancji przeciwbakteryjnych (kwas mlekowy, nadtlenuk wodoru), zdolność do przylegania i współzawodnictwo o receptory adhezyjne z patogenami, rywalizacja z ewentualnymi patogenami o składniki odżywcze oraz stymulacja układu odpornościowego [14]. Spożycie wyrobów zawierających tzw. probiotyki poprawia, zarówno ilościowo jak i jakościowo, mikrobiotę ludzkiego przewodu pokarmowego. Już na przełomie XVIII i XIX wieku rosyjski uczoney Miecznikow uważał, że picie fermentowanego mleka pomaga w zatruciach pokarmowych i wpływa na długowieczność [14, 19, 32]. Jak pisze Fuller stosowanie probiotyków jest często skuteczną metodą zapobiegania wzrostowi chorobotwórczych drobnoustrojów [14].

W toku badań nad bakteriami kwasu mlekowego posługiwano się różnymi definicjami dotyczącymi probiotyków. Dawniej probiotykami nazywano bak-

\* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Czysta 18, 31-121 Kraków; tel. 69 438 00 57; e-mail: klosmartha@gmail.com

terie, zwłaszcza należące do grupy LAB oraz pobudzające wzrost innych drobnoustrojów [18]. Obecnie probiotyki charakteryzuje się jako jedną lub mieszaną kulturę żywych mikroorganizmów, które wspierają mikrobiologiczną równowagę przewodu pokarmowego oraz mogą mieć korzystny wpływ na zdrowie człowieka [18]. Ishibashi określa je jako żywność lub suplementy diety zawierające żywe kultury bakterii [19], które znajdują zastosowanie w terapii chorób jelitowych, ale posiadają także potencjał patogenny i mogą przyczynić się do powstawania zakażeń oportunistycznych [25]. WHO definiuje probiotyki jako żywe mikroorganizmy, których odpowiednia liczba przynosi zdrowotne korzyści gospodarzowi [37].

De Vos przypisuje bakterie kwasu mlekowego do typu *Firmicutes*, czyli Gram-dodatnich drobnoustrojów, mających niską zawartość guaniny i cytozyny oraz używanych jako startery w przemysłowej produkcji żywności fermentowanej, zwłaszcza produktów mlecznych [11]. Badania molekularne wykazały, że plazmidowe transpozony rodzaju *Lactobacillus* kodują wiele związków przydatnych przemysłowo m.in. laktozę i cytrynian – właściwość ta może być wykorzystana w genetycznym modyfikowaniu szczepów [11].

Mikroorganizm, będący probiotykiem, musi także tolerować trudne wewnętrzne warunki panujące w układzie pokarmowym człowieka [30]. W celu określenia bezpieczeństwa probiotyku należy zbadać jego potencjalną chorobotwórczość obejmującą wytwarzane toksyny oraz szkodliwe substancje wydzielane na drodze przemian metabolicznych [19]. Zatem warunkiem jaki muszą spełnić szczepy probiotyczne jest brak sekrecji szkodliwych substancji (amoniak czy drugorzędowe kwasy żółciowe) w swoim szlaku aktywności metabolicznej gdyż działają one kancerogennie na komórki przewodu pokarmowego. Niektóre gatunki posiadają także zdolność wiązania, fibronektyny, fibrynogenu oraz kolagenu, czym przyczyniają się m.in. do agregacji płytek krwi [18, 22].

Jednak bakterie kwasu mlekowego zostały uznane ogólnie za bezpieczne przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA), gdyż wcześniejsze raporty dokumentowały, że ryzyko zakażeń spowodowanych *Lactobacillus* sp. jest bardzo niskie oraz rzadko fatalne w skutkach [9]. Współczesne badania wykazały, że nadmierne spożycie probiotyków i produktów fermentowanych może stać się przyczyną chorób i zakażeń *Lactobacillus* sp.

## 2. Czynniki zwiększające ryzyko zakażeń *Lactobacillus* sp.

Szczególnie podatne na zakażenia bakteriami kwasu mlekowego są osoby z obniżoną odpornością, pacjenci z trwałą, utrzymującą się neutropenią [1, 18, 20,

24] oraz przewlekle chorzy, zwłaszcza cukrzycy [1, 13, 16, 20, 24, 28, 30]. Ishibashi do czynników zwiększających ryzyko zakażeń oportunistycznych, spowodowanych zakażeniem *Lactobacillus* sp., zalicza: uszkodzenia skóry, przewlekle choroby, nowotwory oraz nieprawidłowe stosowanie leków [20]. Carretto opisuje czynniki wpływające na rozwój lactobacillemii – przeszczep organu, immunosupresja i wcześniejsze stosowanie wankomycyny [7].

Cannon opisuje przypadek pacjenta z ropniem wątroby, który na kilka miesięcy przed zakażeniem *Lactobacillus* sp., stosował dietę bogatą w napoje mleczne zawierające *L. rhamnosus* GG [5]. Gouriet określa ryzyko zakażenia *Lactobacillus* sp. jako zdecydowanie niskie i szacuje, że tylko 0,05–0,4% z wszystkich przedstawionych przypadków infekcyjnego zapalenia wsierdza i bakteremii, to przypadki zależne od *Lactobacillus* sp. [15]. Jednakże DuPrey szacuje jednoroczną przeżywalność po stwierdzeniu lactobacillemii na 48% do 69% [13]. W większości przypadków przyczyną zgonu była choroba podstawowa, niemniej jednak zakażenie przyczyniło się do niej w znacznym stopniu. Carretto zwraca uwagę na inną cechę bakterii kwasu mlekowego, tj. ich zdolność do adhezji do powierzchni abiotycznych, w tym przypadku cewnika zastosowanego u pacjenta [7].

Do czynników wpływających na podatność na zakażenie należą również: stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania, w szczególności wankomycyny [1, 5, 17, 18, 24, 28], stan po transplantacji [1, 5, 7, 15, 24, 28], nowotwory, wady serca, zwłaszcza zastawek [7], nadmierne spożywanie mleka, produktów mlecznych [2, 5, 28] i probiotyków [15, 17, 30], hamowanie układu immunologicznego pacjenta w trakcie transplantacji lub leczenia [2, 13, 15, 17, 18, 24, 28], ingerencje chirurgiczne oraz procedury inwazyjne, szczególnie w układ oddechowy i pokarmowy [1, 7, 15], długi czas cewnikowania żylnego [15, 24]. Stąd w przypadku pacjentów bardzo obciążonych wskazanymi czynnikami, zwłaszcza kardiologicznie, należy z dużą rozważą podchodzić do stosowania probiotyków w postaci suplementów diety.

Według Cannona prawdopodobną przyczyną 47% przypadków bakteryjnego zapalenia wsierdza, spowodowanego *Lactobacillus* sp., mogło być leczenie stomatologiczne lub stan uzębienia pacjenta [5]. Natomiast w trzech przypadkach, jako przyczynę wskazano nadmierne spożycie produktów mlecznych [5]. W ponad 60% przypadków bakteryjne zapalenie wsierdza powodowały szczepy *Lactobacillus casei*, następnie *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus acidophilus* [18].

## 3. Identyfikacja *Lactobacillus* sp.

Bardzo trudno jest przeprowadzić pełną diagnostykę mikrobiologiczną *Lactobacillus* sp. ze względu m.in. na trudności w jego hodowli oraz podobieństwo

do innych bakterii stąd konieczność zastosowania nowoczesnych metod molekularnych. Często pałeczki *Lactobacillus* są mylone z *Bifidobacterium* lub traktowane jako zanieczyszczenie hodowli, co znacznie przedłuża diagnostykę chorego i jego leczenie. Na podstawie liczby przypadków oraz ciężkości ich przebiegu

(materiały badane: krew, ropnie, płyn otrzewnowy i mózgowo-rdzeniowy, wsierdzie) za najbardziej chorobotwórczy uznaje się gatunek *L.rhamnosus* [2–4, 7, 15, 16, 18] (tab. I). Gatunek ten, razem z *L. paracasei* i *L. casei*, posiada ważne znaczenie kliniczne według danych przedstawionych przez Russo [28].

Tabela I  
Gatunki *Lactobacillus* wyizolowane z określonych miejsc zakażonych oraz zastosowana antybiotykoterapia

Gatunek	Lokalizacja zakażenia	Stosowana antybiotykoterapia		Piśmiennictwo
		skuteczna	nieskuteczna	
<i>Lactobacillus</i> sp.	wsierdzie zastawki	penicylina, aminoglikozydy	wankomycyna, cefalosporyna, beta-laktamy	[1]
	krew	penicylina, beta-laktamy, aminoglikozydy, ampicylina, cefalotyna, streptomycyna, gentamycyna, cefalosporyna, cefalorydyna, cefazolin, cefamandol, klindamycyna, tobramycyna, chloramfenikol	wankomycyna, cefoksytyna, cefalotyna, metronidazol, norfloksacyna, cyprofloksacyna, trimetoprim-sulfametoksazol	
<i>Lactobacillus</i> sp.	krew	piperacylina, tazobactam, metronidazol	–	[14]
<i>L. rhamnosus</i>	krew po operacji wstawienia zastawki aortalnej	penicylina G + gentamycyna, penicylina V + probenecid	–	[2]
<i>L. rhamnosus</i>	krew po drenażu ropni	penicylina G, gentamycyna, metronidazol, flukonazol, erytromycyna, ciprofloksacyna	imipenem, flukonazol	[2]
<i>L. rhamnosus</i>	krew po wykryciu ropnia kulszowo-odbytniczego	ampicylina, netylmycyna, penicylina, gentamycyna	–	[2]
<i>L. rhamnosus</i>	płyn otrzewnowy	wankomycyna, gentamycyna, erytromycyna	–	[7]
<i>L. rhamnosus</i>	krew	–	tazocin, gentamycyna, wankomycyna, ryfampicyna	[7]
<i>L. rhamnosus</i>	krew	penicylina, gentamycyna, linezolid	wankomycyna	[15]
<i>L. rhamnosus</i>	krew, płyn mózgowo-rdzeniowy	ampicylina, ryfampicyna, erytromycyna, linkomycyna, pristinamycyna	benzylpenicylina, cefotaksym, aminoglikozydy, trimetoprim-sulfametoksazol, fluorochinolony, kwas fusydowy, tetracyklina, wankomycyna	[16]
<i>L. rhamnosus</i>	krew	ampicylina, cefotaksym, imipenem tykarcylina + kwas klawulanowy	wankomycyna, amikacyna	[18]
<i>L. rhamnosus, L. casei</i>	krew	erytromycyna, klindamycyna	wankomycyna	[3]
<i>L. rhamnosus, L. plantarum, L. casei</i>	wsierdzie	ciprofloksacyna, erytromycyna ampicylina, penicylina, aminoglikozydy	gentamycyna, wankomycyna	[3]
<i>L. casei</i>	infekcje zlokalizowane (np. płuc, ropnie)	ciprofloksacyna, erytromycyna	penicylina, ampicylina, cefazolin, wankomycyna	[3]
<i>L. casei, L. paracasei</i>	krew	tigecyklina, daptomycyna, ampicylina, amoksycylina	–	[17]
<i>L. paracasei</i>	krew	erytromycyna, ceftriakson, gentamycyna, ciprofloksacyna	–	[2]
<i>L. delbrueckii</i>	nerki krew	ampicylina	ciprofloksacyna, wankomycyna, cefepim	[6]
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	krew	ampicylina, gentamycyna	–	[2]
<i>L. fermentum</i>	pęcherzyk żółciowy	linezolid	wankomycyna	[5]
<i>L. curvatus</i>	krew	ampicylina	–	[2]
<i>L. acidophilus</i>	krew	–	wankomycyna	[3]

Brak danych (–)

Według fińskich danych z lat 1990–2000 rodzaj *Lactobacillus* stanowił 0,1–0,2% wszystkich izolatów pochodzących z hodowli krwi pacjentów z sepsą [30]. Badania pokazują, że u pacjentów z bakteremią najlepszym materiałem do izolacji gatunku *L. rhamnosus* jest krew – potwierdziło to 16 z 25 przypadków, w pozostałych *L. rhamnosus* izolowano także z płuc, ropni i gardła [15]. Zazwyczaj aby określić przynależność taksonomiczną bakterii, stosuje się barwienie metodą Grama oraz określa się charakterystyczne cechy wzrostu kolonii i wzory biochemiczne. Współczesne metody taksonomii wykorzystują techniki fenotypowe oraz analizy genetyczne. Do metod fenotypowych zalicza się badanie składu ściany komórkowej, „białkowy odcisk palca”, czyli analizę rozpuszczalnych cytoplazmatycznych białek oraz elektroforetyczną ruchliwość wybranych enzymów [23]. Identyfikując biochemicznie prawdopodobnie dosyć łatwym do zidentyfikowania tymi metodami, może być *L. rhamnosus* posiadający ramnozę jako komponent ściany komórkowej i mogący ją fermentować. Do testów biochemicznych zaliczają się jeszcze: test redukcji azotanów, utleniania glukonianu, hydrolizy skrobi [35]. Natomiast analiza fermentacji L-arabinozy, redukcji azotanu i wzrostu w 20°C pozwala odnotować pewne różnice między gatunkami *L. reuteri* i *L. fermentum* [19,23]. Fińskie badania pokazały, że stosując konwencjonalne metody możliwe jest zidentyfikowanie tylko 30–50% izolatów [31], dokładna identyfikacja wymaga analizy molekularnej [36].

Najpewniejszą, najdokładniejszą oraz szybką i tanią metodą identyfikacji izolatów *Lactobacillus* sp. okazało się użycie metody MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), czyli jonizację próbki połączoną z pomiarem jej masy w spektrometrze masowym [12, 34]. W przypadku badań materiałów klinicznych, za pomocą MALDI-TOF MS, czas ma szczególne znaczenie, gdyż wykazano bezpośrednią zależność między wykorzystaniem szybkich metod diagnostycznych, a śmiertelnością pacjentów [12]; metoda ta znacznie redukuje czas oczekiwania na oznaczenie gatunku. Do zalet MALDI-TOF MS, oprócz wcześniej wspomnianych, należy wiarygodność i powtarzalność wyników oraz zdolność do identyfikacji szerokiej gamy mikroorganizmów [12]. MALDI-TOF MS używa się także do szybkiego wykrycia wrażliwości na antybiotyki – mikroorganizm oporny i wrażliwy na dany antybiotyk różni się w zakresie mas i posiada dwa profile widma [34]. Ograniczeniem tej metody może być wymóg czystej i dobrze wyizolowanej kultury oraz brak rozróżnienia blisko spokrewnionych mikroorganizmów. Dodatkowo w przypadku organizmów anaerobowych bazy danych są jeszcze stosunkowo skąpe i wymagają dalszego rozszerzenia i rozwoju, a metody ekstrakcji standaryzacji [12].

Drugą coraz częściej stosowaną metodą jest zsekwencjonowanie genu 16S rRNA. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) jest procedurą standardową w identyfikowaniu gatunków mikroorganizmów [15]. Sekwencjonowanie chromosomu plazmidowego pozwala na dokładną klasyfikację, odkrywanie nowych szczepów, wprowadzanie zmian i przeklasyfikowywanie starych gatunków oraz rozwój taksonomii rodzaju *Lactobacillus* [4]. Salminen opisuje przypadek, kiedy izolaty potencjalnie nie należące do rodzaju *Lactobacillus* i nie rosnące na podłożu agarowym MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) mogą być zidentyfikowane metodą sekwencjonowania 16S rDNA [30].

Do wykrycia *L. rhamnosus* w próbkach fermentowanej żywności lub preparatach probiotycznych stosuje się metodę FAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism) bazującą na selektywnej amplifikacji materiału genetycznego podczas reakcji PCR z trawienia genomowego DNA [4]. Reakcję PCR prowadzi się z użyciem znakowanych fluorescencyjnie starterów.

Oprócz metody FAFLP skutecznymi molekularnymi technikami są:

1. analiza enzymów restrykcyjnych (REA-Restriction Enzyme Analysis) – DNA jest trawione przez endonukleazy restrykcyjne, następnie fragmenty rozdziela się w żelu agarozowym, a złożony wzór jest analizowany komputerowo; trudność metody polega na doborze właściwych enzymów, dzięki którym program komputerowy rozróżni dane szczepy [19];
2. losowa amplifikacja polimorficznego DNA (RAPD-Randomly Amplified Polymorphic DNA) – opiera się na reakcji PCR, polega na przyłączaniu starterów w niskiej temperaturze i amplifikacji interesujących nas fragmentów [19];
3. rybotypowanie – wzory restrykcyjne rRNA są tworzone przez hybrydyzację z 23S i 16S rRNA, trawienie chromosomalnego DNA i elektroforeza następuje w trakcie Southern Blotting, następnie DNA przenieszone jest na membranę; rybotypowanie jest łatwiejsze i stabilniejsze od REA [19];
4. amplifikacja długości fragmentów polimorficznych AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – polega na trawieniu DNA dwoma enzymami restrykcyjnymi oraz amplifikacji fragmentów i ich rozdzieleniu w żelu poliakrylamidowym [28].

#### 4. Chorobotwórczość *Lactobacillus* sp.

*Lactobacillus* sp. najczęściej powiązany jest z: zapaleniem wsierdza [1, 3, 4, 7, 10], opon mózgowych [1, 3, 10, 17], sepsą [1, 10], zakażeniem dróg moczowych [1, 7, 17], układu rodowego u kobiet [13, 17], próchnicą zębów [10, 17, 35]. Odnotowano także pojedyncze

przypadki zapalenia opon mózgowych spowodowanego *L. rhamnosus* w następstwie bakteremii i allogeicznego przeszczepu komórek krwiotwórczych [26], niedokrwiennie zapalenie okrężnicy [24], zapalenie błon płodowych [5], wrzodziejące zapalenie okrężnicy [25], rozwarstwienie aorty i zapalenie śluzówki macicy [28], zakażenie u 6-dniowego noworodka prawdopodobnie związane z ograniczeniem wzrostu wewnątrzmacicznego [29].

W latach 1995–2000, w Finlandii, opisano 90 przypadków bakteremii spowodowanej zakażeniem *Lactobacillus* sp., w tym 28 przypadków zdiagnozowano w Centralnym Szpitalu Uniwersyteckim w Helsinkach [30]. Arpi opisuje sześć przypadków bakteremii, w tym pięć ze stanem obniżonej odporności jako prawdopodobnym czynnikiem zwiększającym ryzyko zakażenia *Lactobacillus* sp. [2]. Główne objawy zakażenia krwi [1, 3, 4, 17, 19] o etiologii *Lactobacillus* sp., to gorączka [1, 4, 6, 14], leukocytoza [1, 4], dreszcze [1, 4] i niedociśnienie [4, 6]. Średnia wieku pacjentów z bakteremią powodowaną *Lactobacillus* sp. mieściła się w granicach 55 a 60 roku życia i cecha ta pojawiała się bez względu na płeć i towarzyszące choroby [1]. Odnotowywano także współistniejące odmiedniczkowe zapalenie nerek [1], infekcje przeszczepu aorty [1] oraz ropnie wewnątrzbrzusne [3, 4, 7].

Bakteremia i odmiedniczkowe zapalenie nerek o etiologii *Lactobacillus* sp. to rzadki przypadek [13]. Na sepsę odnerkową składa się wiele przyczyn m.in. kamica nerkowa, niekontrolowana cukrzyca, obniżona odporność. Istnieją także niepotwierdzone przypadki zakażeń *Lactobacillus* sp., są to m.in. ropień wątroby u pacjentki z cukrzycą, która przyjmowała *L. rhamnosus*; zakażenie *L. rhamnosus* po ekstrakcji zęba u pacjenta przyjmującego tabletki probiotyczne do żucia; sepsa u sześciotygodniowego niemowlęcia po doustnym podaniu *Lactobacillus* sp. [16].

Rodzaj *Lactobacillus* bytujący w ludzkim organizmie może także produkować glikozydazy i proteazy umożliwiające rozkład ludzkich glikoprotein [28]. Wspomniane enzymy mogą być również czynnikami działającymi patogennie w rozwijającym się zapaleniu wsierdza ze względu na możliwość kolonizacji powierzchni naczyń krwionośnych [28]. Badania Harty wykazały, że większość znajdujących się w jamie ustnej gatunków *Lactobacillus* sp. posiada zdolność do wywoływania agregacji płytek krwi, w tym najważniejsze to gatunki *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* [17]. Potwierdza to związek jaki przedstawił Cannon w swoich badaniach dotyczący wpływu ingerencji stomatologicznych na zapalenie wsierdza [5]. Dodatkowo w badaniu czynników patogenyzy zapalenia wsierdza stwierdzono, że szczepy wywołujące tę chorobę produkują dwa enzymy N-acetylo-beta-D-glukozaminidazę i alfa-D-galaktozydazę aktywujące

białko C podobne, oraz zaktywowany czynnik X i czynnik Hagemana, które zaburzają proces krzepnięcia krwi powodując wytrącanie skrzepów fibrynowych [28]. Ponadto pałeczki *Lactobacillus* sp. dobrze wiążą się z kolagenem typu I (wiąże fibronektynę) i V (w miejscu uszkodzonego śródbłonka), co może mieć znaczenie we wczesnych stadiach kolonizacji uszkodzonej zastawki serca [18]. Jak donosi Harty całkowitą inhibicję agregacji uzyskano dodając do hodowli EDTA, RGDS – inhibitora fibronektyny i fibrynogenu oraz różne stężenia dipirydamolu [18]. Podobny efekt zahamowania agregacji osiągnięto redukując dostępność jonów wapnia i enzymów uczestniczących w reakcji [18]. Istotne znaczenie ma również pH środowiska – przy niskim pH rośnie ilość związanego przez LAB fibrynogenu i fibronektyny i nawet po powrocie do neutralnego pH bakterie zatrzymują pewien procent związanych białek [18].

Badania Bernardeau wykazały, że *Lactobacillus* sp. może produkować także inne szkodliwe dla ludzkiego organizmu substancje, np. D-mleczan i aminy biogenne kumulujące się w fermentowanych produktach [4]. Wtórne zakażenia krwi o źródle w zakażeniach układu pokarmowego wiążą się ze zdolnością translokacji *Lactobacillus* sp. przez śluzówkę jelit do krwioobiegu – prawdopodobną pierwotną przyczyną było niedokrwiennie zapalenie jelita grubego [24]. Przykładem może być pacjent z wrzodziejącym zapaleniem okrężnicy, który zachorował na sepsę w trakcie leczenia probiotykami i obniżającymi odporność kortykosteroidami. Inne, potencjalnie szkodliwe, właściwości rodzaju *Lactobacillus* odnotowane w ludzkim przewodzie pokarmowym to m.in. dekarboksylacja tyrozyny, aktywność dekonjugacyjna kwasów żółciowych, aktywność enzymatyczna (produkcja azoreduktazy, nitroreduktazy,  $\beta$ -glukuronidazy, glikozydazy) oraz degradacja kwasu hialuronowego [4].

Naukowcy stają przed problemem użycia genetycznie zmodyfikowanych bakterii kwasu mlekowego jako wektorów do przenoszenia rekombinowanych protein w chorobach autoimmunologicznych, wrzodziejącym zapaleniu jelita, chorobie Crohna czy nowotworach [6]. Dowiedziono, że zmodyfikowane mikroorganizmy zmniejszają stan zapalny i skutki uboczne stosowania konwencjonalnych leków oraz mogłyby zmniejszyć koszty leczenia. Oprócz zalet metoda ta posiada wiele wad. Główną jest możliwość przeniesienia antybiotykooporności ze zmodyfikowanego mikroorganizmu na mikroflorę jelitową, a u osób podatnych na zakażenia LAB, odnotowywano zakażenia oportunistyczne oraz działanie prozapalne.

Badano *in vitro* wpływ bakterii kwasu mlekowego na system odpornościowy człowieka [33]. Stwierdzono, że z czterech szczepów *L. acidophilus* (La1, La3, La10, La18), największą zdolność przylegania do monowarstw komórek Caco-2, niezależnie od stężenia jonów

wapnia, posiada *L. acidophilus* La1 i zdolność ta obniża się w świeżym buforze. Wzrost spożycia *Lactobacillus* sp. z pokarmem znacznie podnosi aktywność fagocytarną monocytów i ogólnie zwiększa aktywność fagocytarną granulocytów, jednak efekt ogólny nie ma wielkiego znaczenia gdyż odsetek monocytów we krwi jest mały [31].

## 5. Podsumowanie

Chociaż rodzaj *Lactobacillus* nie jest uważany za znacząco chorobotwórczy, to u pacjentów z osłabioną odpornością, może stać się przyczyną zakażeń i poważnych niekiedy śmiertelnych chorób. Warto wziąć pod uwagę, że z pozoru bezpieczny *Lactobacillus* sp. jest dosyć trudny w hodowli i identyfikacji, często wybranie nawet kilku metod klasycznych jest niemięrodajne. Ze względu na produkcję przez bakterie kwasu mlekowego wielu czynników zjadliwości, fibrynogenu czy enzymów zaburzających proces krzepnięcia wydaje się oczywisty związek tych mikroorganizmów z chorobami serca – zapaleniem wsierdza czy chorobami zastawek.

Zdrowy, stabilny mikrobiom jest w pełni efektywny w regulacji mechanizmów ochronnych człowieka, zatem i zdrowy organizm nie potrzebuje dodatkowych, dostarczanych w pożywieniu bądź w suplementach diety mikroorganizmów probiotycznych.

## Piśmiennictwo

1. Antony S.J.: Lactobacillemia: an emerging cause of infection in both the immunocompromised and the immunocompetent host. *J. Natl. Med. Assoc.* **92**, 83–86 (2000)
2. Arpi M., Vancanneyt M., Swings J., Leisner J.J.: Six cases of *Lactobacillus* bacteraemia: Identification of organisms and antibiotic susceptibility and therapy. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**, 404–435 (2003)
3. Bayer A.S., Chow A.W., Morrison J.O., Guze L.B.: Bactericidal synergy between penicillin or ampicillin and aminoglycosides against antibiotic-tolerant *Lactobacilli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 359–363 (1980)
4. Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Guéguen M.: Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 278–285 (2008)
5. Cannon J.P., Lee T.A., Bolanos J.T., Danziger L.H.: Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**, 31–40 (2005)
6. Cano-Garrido O., Seras-Franzoso J., Garcia-Fruitós E.: Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. *Microb. Cell Fact.* DOI 10.1186/s12934-015-0313-6 (2015)
7. Carretto E., Barbarini D., Marzani F.C., Fumagalli P., Monzillo V., Marone P., Emmi V.: Catheter-related bacteremia due to *Lactobacillus rhamnosus* in a single-lung transplant recipient. *Scand. J. Infect. Dis.* **33**, 780–782 (2001)
8. Chen P.-W., Tseng S.-Y., Huang M.-S.: Antibiotic susceptibility of commensal bacteria from human milk. *Curr. Microbiol.* DOI 10.1007/s00284-015-0925-4 (2015)
9. Chery J., Dvoskin D., Morato F.P., Fahoum B.: *Lactobacillus fermentum*, a pathogen in documented cholecystitis. *Int. J. Surg. Case Rep.* **4**, 662–664 (2013)
10. Chin J., Turner B., Barchia I., Mullbacher A.: Immune response to orally consumed antigens and probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 55–66 (2000)
11. de Vos W.M.: Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. *Microb. Cell Fact.* **10**, (Suppl 1): S2 (2011)
12. Dingle T.C., Butler-Wu S.M.: MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clin. Lab. Med.* **33**, 589–609 (2013)
13. DuPrey K.M., McCrea L., Rabinowitch B., Azad K.N.: Pyelonephritis and bacteremia from *Lactobacillus delbrueckii*. *Case Rep. Infect. Dis.* 2012:745743 (2012)
14. Fuller R.: Probiotics in human medicine. *Gut*, **32**, 439–442 (1991)
15. Gouriet F., Million M., Henri M., Fournier P.-E., Raoult D.: *Lactobacillus rhamnosus* bacteremia: an emerging clinical entity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 2469–2480 (2012)
16. Hammerman C., Bin-Nun A., Kaplan M.: Safety of probiotics: comparison of two popular strains. *BMJ*, **333**, 1006–1008 (2006)
17. Harty D.W.S., Patrikakis M., Hume E.B.H., Oakey H.J., Knox K.W.: The aggregation of human platelets by *Lactobacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2945–2951 (1993)
18. Harty D.W.S., Oakey H.J., Patrikakis M., Hume E.B.H., Knox K.W.: Pathogenic potential of lactobacilli. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 179–189 (1994)
19. Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U.: Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 365–373 (2001)
20. Ishibashi N., Yamazaki S.: Probiotics and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 465–470 (2001)
21. Kim K.S., Morrison J.O., Bayer A.S.: Deficient autolytic enzyme activity in antibiotic-tolerant lactobacilli. *Infect. Immun.* **36**, 582–585 (1982)
22. Kirjavainen P.V., Salminen S.J. i wsp.: *In vitro* adhesion and platelet aggregation properties of bacteremia-associated lactobacilli. *Infect. Immun.* **67**, 2653–2655 (1999)
23. Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G.: Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**, 103–125 (1998)
24. Kulkarni H.S., Khoury C.C.: Sepsis associated with *Lactobacillus* bacteremia in a patient with ischemic colitis. *Indian J. Crit. Care Med.* **18**, 606–608 (2014)
25. Meini S., Laureano R., Fani L., Tascini C., Galano A., Antonelli A., Rossolini G.M.: Breakthrough *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in an adult patient with severe active ulcerative colitis: case report and review of the literature. *J. Infect. Dis.* DOI 10.1007/s15010-015-0798-2 (2015)
26. Robin F., Paillard C., Marchandin H., Demeocq F., Bonnet R., Hennequin C.: *Lactobacillus rhamnosus* meningitis following recurrent episodes of bacteremia in a child undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 4317–4319 (2010)
27. Ruoff K.L., Kuritzkes D.R., Wolfson J.S., Ferraro M.J.: Vancomycin-resistant Gram-positive bacteria isolated from human sources. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2064–2068 (1988)
28. Russo A., Angeletti S., Lorino G., Venditti C., Falcone M., Dicunzio G., Venditti M.: A case of *Lactobacillus casei* bacteraemia associated with aortic dissection: is there a link? *New Microbiol.* **33**, 175–178 (2010)
29. Sadowska-Krawczenko I., Paprzycka M., Korbal P., Wiatrzyk A., Krysztopa-Grzybowska K., Polak M., Czajka U., Lutyńska A.:

- Lactobacillus rhamnosus* GG suspected infection in a newborn with intrauterine growth restriction. *Benef. Microbes*. **5**, 397–402 (2014)
30. Salminen M.K., Tynkkynen S., Rautelin H., Saxelin M., Vaara M., Ruutu P., Sarna S., Valtonen V., Järvinen A.: *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin. Inf. Dis.* **35**, 1155–1160 (2002)
  31. Salminen M.K., Rautelin H., Tynkkynen S., Poussa T., Saxelin M., Valtonen V., Järvinen A.: *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clin. Infect. Dis.* **42**, e35–44 (2006)
  32. Salminen S., Arvilommi H.: Probiotics demonstrating efficacy in clinical settings. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1577–1578 (2001)
  33. Schiffrin E.J., Brassart D., Servin A.L., Rochat F., Donnet-Hughes A.: Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 515–520 (1997)
  34. Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.-E., Rolain J.M., Raoult D.: Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 543–551 (2009)
  35. Sharpe M.E., Hill L.R., Lapage S.P.: Pathogenic lactobacilli. *J. Med. Microbiol.* **6**, 281–286 (1973)
  36. Wallet F., Dessein R., Armand S., Courcol R.J.: Molecular diagnosis of endocarditis due to *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Clin. Infect. Dis.* **35**, e117–119 (2002)
  37. World Health Organization: Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf?ua=1) (data dostępu 30.04.2016)



Kamila Formińska<sup>1\*</sup>, Aleksandra Anna Zasada<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego  
– Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło we wrześniu 2016 r.  
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Chorobotwórczość, źródła i drogi zakażenia. 3. Występowanie choroby. 4. Wewnątrzkomórkowy cykl życiowy *F. tularensis*. 5. Czynniki zjadliwości *F. tularensis*. 5.1. Otoczka. 5.2. Lipopolisacharyd (LPS). 5.3. Pili typu IV. 5.4. Regulator MglA. 5.5. *Francisella* Pathogenity Island (FPI). 5.6. Białka błony zewnętrznej. 5.7. Białka wydzielnicze i systemy sekrecji. 6. Podsumowanie

### *Francisella tularensis* – a deceitful pathogen

**Abstract:** *Francisella tularensis* is an intracellular bacterial pathogen which causes a potentially lethal disease named tularemia. Some studies have been conducted to describe and identify the virulence factors of *F. tularensis*. This pathogen is able to infect a variety of cells of various hosts, including wild animals, especially rabbits, hares and rodents, and humans. This may suggest that genes of *F. tularensis* must adapt to many different intraorganismal environments. Still, little is known about the virulence of *F. tularensis*. This review focuses on the main virulence factors of *F. tularensis* which are involved in intramacrophage replication and its survival mechanisms during infection.

1. Introduction. 2. Pathogenicity and source of infection. 3. Epidemiology. 4. Intracellular life cycle. 5. Virulence factors. 5.1. Capsule. 5.2. LPS. 5.3. Type IV Pili (Tfp). 5.4. Regulator MglA. 5.5. *Francisella* Pathogenity Island (FPI). 5.6. Outer membrane proteins (OMP). 5.7. Secreted proteins and secretion systems. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** *F. tularensis*, tularemia, czynniki zjadliwości

**Key words:** *F. tularensis*, tularemia, virulence factors

## 1. Wstęp

Do rodzaju *Francisella* przez wiele lat zaliczane były zaledwie trzy gatunki: *F. tularensis*, *F. philomiragia* i *F. novicida*. Jednakże w ostatnich latach opisano kolejne gatunki należące do tego rodzaju: *F. guangzhouensis*, *F. halioticida*, *F. hispaniensis*, *F. noatunensis* oraz *F. piscicida* [9, 43, 49, 68, 73]. Ponadto, *Wolbachia persica* została przeklasyfikowana jako *F. persica* [49], a *F. novicida* jako *tularensis* obejmuje obecnie cztery podgatunki: *F. tularensis* spp. *tularensis* – określany również jako Typ A, *F. tularensis* spp. *holarctica* – określany też jako Typ B, *F. tularensis* spp. *mediasiatyca* oraz *F. tularensis* spp. *novicida*, których występowanie jest ściśle związane z obszarem geograficznym [45]. Uwzględniając obszar występowania oraz strukturę genomu Typ A *F. tularensis* podzielono dalej na podtypy A.I i A.II [24, 45]. Typ A występuje głównie w Ameryce Północnej, przy czym podtyp A.I dominuje w części centralnej i wschodniej kontynentu, a podtyp A.II w zachodniej części Stanów Zjednoczonych. Typ B występuje na całym świecie, a w szczególności w Europie i Azji. *F. tularensis* spp. *mediasiatyca* wykrywana była w rejonach centralnej i środkowej Azji, natomiast *F. tularensis* spp. *novicida* jest rzadko izolowana, głównie w Ameryce Północnej, Tajlandii [51] a w ostatnim czasie także w Australii [35, 63, 67, 95].

Bakteria *F. tularensis* jest wysoce zjadliwą, tlenową, Gram-ujemną pałeczką, o wielkości 0,2–0,5 µm do 0,7–1,0 µm. Jest to wewnątrzkomórkowy patogen – po wnikięciu do organizmu gospodarza bakteria ta zostaje wchłonięta przez makrofagi i namnaża się w nich. W warunkach laboratoryjnych *F. tularensis* do wzrostu wymaga obecności cystyny bądź cysteiny w podłożu. Stwierdzono jednak występowanie szczepów atypowych, które zdolne są do wzrostu bez obecności wymienionych związków [8, 46, 50]. Pałeczki *Francisella* nie tworzą przetrwalników, są nieruchliwe – słabo katalazododatnie, oksydazoujemne o charakterystycznym komórkowym profilu kwasów tłuszczowych. Zdolne są one do wzrostu na większości komercyjnych podłoży z dodatkiem krwi, nie rosną lub rosną słabo na podłożach z agarem [50, 56]. Większość szczepów zdolna jest do tworzenia biofilmu, co ma wpływ na patogenezę [61].

Ze względu na bardzo niską dawkę infekcyjną, łatwość rozprzestrzeniania się drogą powietrzną [24] i wysoką chorobotwórczość, *F. tularensis* wymaga specjalnego nadzoru sektora zdrowia publicznego i zaliczana jest do niebezpiecznych czynników biologicznych kategorii A wg CDC [16].

W naturalnych warunkach bakterie te można izolować ze skażonej wody, siana oraz gleby, gdzie mogą bytować przez wiele tygodni w warunkach obniżonej

\* Autor korespondencyjny: Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 542 12 12; e-mail: kforminska@pzh.gov.pl

temperatury [59]. Rezerwuarem tego zarazka są m.in. myszy, szczury, nornice, wiewiórki, króliki i zające.

## 2. Chorobotwórczość, źródła i drogi zakażenia

Bakterie *F. tularensis* wywołują tularemię – ostrą chorobę zakaźną ludzi i zwierząt zwaną inaczej dżumą gryzoni, dawniej gorączką królików (rabbit fever), gorączką jelenich much (deer-fly fever), chorobą straganiarzy (market men's disease) w USA, chorobą zającą (yato-bayo) i chorobą Ohary w Japonii oraz chorobą łowców szczurów wodnych w Rosji [27, 36, 37]. Tularemia występuje bardzo szeroko wśród wielu gatunków, nie tylko dzikich zwierząt: opisano przypadki wśród zajączaków, gryzoni, zwierząt mięsożernych, ryb, bezkręgowców oraz stawonogów. Choroba może występować również u zwierząt domowych: w 2011 roku opisano pierwszy w Europie przypadek psa chorego na tularemię, który miał kontakt z dzikim zającem [15, 66].

Wektorami tularemii mogą być owady ssące, takie jak komary, pluskwy oraz kleszcze. Człowiek może zakażać się *F. tularensis* poprzez bezpośredni kontakt z chorym zwierzęciem, jego tkankami (przez uszkodzoną skórę, zadrapania, zranienia), drogą aerogenną (poprzez wdychanie pyłu roślinnego zanieczyszczonego odchodami gryzoni), drogą pokarmową (poprzez spożywanie skażonej żywności lub wody), przez spojówkę w wyniku zatarcia oczu brudnymi palcami oraz ukąszenia zakażonych stawonogów [28]. W ostatnim czasie coraz częściej odnotowywane są przypadki odkleszczowego zakażenia tularemią [25, 39, 75].

Pałeczki *F. tularensis* w kleszczach namnażają się bardzo intensywnie. Zakażenie kleszcza może nastąpić we wszystkich jego fazach rozwojowych (larwa, nimfa), co oznacza możliwość przebywania bakterii w organizmie kleszcza w ciągu całego jego życia, tj. nawet kilka lat. Zakażony kleszcz może przenosić zarazek pośród ludzi i zwierząt przez wszystkie swoje fazy rozwoju (transtadialnie), oraz poprzez składanie jaj (transowarialnie). Dzięki takim rezerwuansom w naturalnym ognisku infekcja może istnieć nieograniczenie długo, poprzez cyrkulację zarazka: gryzoń jako dawca – stawonóg jako przenosiciel – gryzoń jako biorca. Dzięki temu zarazek przechowuje się w okresach międzyepidemicznych i przy sprzyjających warunkach powoduje nowe epizootie i epidemie [48].

Tularemia u człowieka przyjmuje następujące postacie kliniczne: wrzodziejącą, węzłową, alginową, żółdkowo-jelitową, płucną, ocznowęzłową oraz durową. [1]. *F. tularensis* może wywoływać również zapalenie wsierdza. [22] Na uwagę zasługują nietypowe formy lub objawy tej rzadkiej choroby, które często mylone są z innymi chorobami chociażby takimi jak: mononukleozą zakaźną, atypowe zapalenie płuc, choroba kociego

pazura czy gruźlica węzłów chłonnych [7]. Występowanie objawów niespecyficznych i nieprawidłowa diagnoza przyczynia się do pominięcia choroby i nieprawidłowego leczenia. Taka sytuacja wpływa często na niedoszacowanie danych epidemiologicznych oraz utrudnia monitorowanie rozprzestrzeniania się choroby. Utrudnione zostaje wówczas oszacowanie ryzyka zagrożenia zdrowia w społeczeństwie i tym samym adekwatna reakcja na ewentualne ryzyko epidemii. Ma to szczególne znaczenie w przypadku zagrożenia bioterrorystycznego. [83].

Podgatunki *F. tularensis* drastycznie różnią się chorobotwórczością dla człowieka. *F. tularensis* spp. *tularensis* charakteryzuje bardzo niska dawka zakaźna od 10 do 50 komórek bakteryjnych oraz śmiertelność na poziomie 5–30%. Zakażenia *F. tularensis* spp. *holarctica* mają łagodniejszy przebieg, a przypadki śmiertelne zdarzają się rzadko [90]. Zakażenia *F. tularensis* spp. *novicida* odnotowywane są sporadycznie w niektórych rejonach Ameryki Południowej i Australii. Natomiast *F. tularensis* spp. *madiaasiatica* nie wywołuje zakażeń u ludzi [106]. Pomimo znaczących różnic w zjadliwości tych czterech podgatunków *F. tularensis* są one w 95–98% identyczne na poziomie genetycznym [17, 92, 93].

## 3. Występowanie choroby

Tularemia występuje endemicznie w większości krajów europejskich. Liczba przypadków zachorowań zwykle nie przekracza 1000 w ciągu roku w krajach Unii Europejskiej. Na obszarach, takich jak Finlandia i Szwecja, ogniska zawierające powyżej setki przypadków rejestrowane są co najmniej raz na dziesięć lat. W innych rejonach ogniska występują sporadycznie. W Hiszpanii w latach 1997–2007 zarejestrowano 916 przypadków tej choroby u ludzi. W latach 2006–2011 największe epidemie miały miejsce w Finlandii w liczbie 1565 przypadków (z których powyżej 400 zanotowano w roku 2006, 2007 oraz 2009), oraz w Szwecji w liczbie 1875 przypadków [71, 87]. W Niemczech od 2005 roku zaobserwowano wzrost liczby zachorowań na tularemię. W ciągu kolejnych 6 lat, liczba potwierdzonych przypadków wyniosła 109 [87], podczas gdy w ciągu 49 poprzednich lat całkowita liczba przypadków wynosiła 184 [41, 84]. W pozostałych krajach Unii Europejskiej liczba zarejestrowanych w tym okresie przypadków wynosiła od 50 do 100. W Polsce ogniska epidemiczne występowały głównie na północy kraju. W latach 2000–2010 zostało w sumie zarejestrowanych 25 przypadków tej choroby na terenie całego kraju. Według danych NIZP-PZH, zanotowano 58 przypadków tularemii u ludzi w latach 1996–2014, przy czym w roku 2011 oraz 2012 odnotowano po 6 przypadków tej choroby. W 2013 liczba zachorowań wzrosła do 8 zdiagnozowa-

nych przypadków, a w 2014 potwierdzono ich siedem [57]. W czasie ostatnich 50 lat większość odnotowanych przypadków tularemii w Polsce związana była z pracą przy królikach i dotyczyła septycznej i durowej postaci tej choroby. Ostatnio coraz częściej odnotowywana jest postać wrzodząco-węzłowa, rozwijająca się po ukąszeniu kleszcza lub innego stawonoga [62].

#### 4. Wewnątrzkomórkowy cykl życiowy *F. tularensis*

Po dostaniu się do organizmu ssaków *F. tularensis* wnika do makrofagów. Jednakże badania wykazały, że posiada zdolność wnikania i przeżywania w różnych typach komórek, m.in. komórkach dendrytycznych, neutrofilach, hepatocytach, nabłonkowych komórkach płucnych.

*F. tularensis* wnika do komórek na drodze nietypowego mechanizmu fagocytozy zapętlającej (looping phagocytosis), który wykorzystuje przebudowę aktywny przez szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i jest silnie zależny od obecności czynnika C3 komplementu i receptora CR3 [19]. Bakterie te mogą również wnikać do komórek poprzez receptory mannozowe, receptory zmiatacze klasy A typu I i II, a także receptory Fcy [69, 70, 81]. Po wnikięciu do komórki makrofaga *F. tularensis* zmienia normalny proces bakteriobójczy: przeciwdziała indukcji wybuchu tlenowego ograniczając w ten sposób narażenie komórek bakteryjnych pobranych przez makrofaga, na działanie aktywnych form tlenu. *F. tularensis* modyfikuje proces dojrzewania fagosomu w taki sposób, aby komórki bakteryjne miały kontakt z procesami endocytarnymi tylko przejściowo. Bakterie *F. tularensis* na początku przebywają w przestrzeni utworzonej przez błonę komórkową makrofaga, która pobiera ograniczoną ilość markerów wczesnego endosomu i późnego endolizosomu, takich jak EEA1, CD63, LAPM1 i LAMP2. Wakuola zawierająca *F. tularensis* nie pobiera kwaśnej hydrolazy katepsyny D i nie łączy się z lizosomem. Następnie *F. tularensis* ucieka z fagosomu do cytozolu komórki, gdzie zaczyna się intensywnie namnażać. Intensywnie namnażająca się w cytozolu *F. tularensis* doprowadza ostatecznie do śmierci komórki, opuszcza ją i infekuje następną komórkę [20, 69].

#### 5. Czynniki zjadliwości *F. tularensis*

Geny wirulencji bakterii są często zlokalizowane w obrębie ruchomych elementów genetycznych, takich jak plazmidy, transpozony, bakteriofagi, wyspy patogenności, które mogą być wymieniane pomiędzy bakteriami na drodze horyzontalnego transferu genów. Jednakże badania wskazują, że w przypadku czterech

podgatunków *F. tularensis* geny związane ze zjadliwością nabyte zostały drogą wertykalnego transferu genów. Analiza genomu *F. tularensis* pozwoliła zidentyfikować 30 genów, które mogły zostać nabyte na drodze horyzontalnego transferu. Jednak żaden z nich nie koduje potencjalnych czynników zjadliwości [35, 88–89]. Zidentyfikowano tylko jedną wyspę patogenności zwaną FPI (*Francisella* Pathogenicity Island), która jest związana z patogennymi właściwościami tego drobnoustroju [33, 64]. Porównanie całych genomów patogennych i niepatogennych podgatunków *F. tularensis* pokazało, że patogenne podgatunki wyewoluowały z niepatogennych na drodze rearanżacji genomu, mutacji punktowych oraz niewielkich delecji i insercji [77]. Poniżej przedstawiamy krótką charakterystykę czynników, które zostały zidentyfikowane jako kluczowe w zjadliwości *F. tularensis*. Jednakże należy zwrócić uwagę, że ze względów bezpieczeństwa, badania prowadzone są zazwyczaj na szczepach o obniżonej zjadliwości, takich jak *F. tularensis* spp. *holarctica* LVS (atenuowany szczep szczepionkowy) czy *F. tularensis* spp. *novicida*, rzadziej na wirulentnym szczepie laboratoryjnym *F. tularensis* spp. *tularensis* Schu S4, co może dostarczać informacji nie obejmujących wszystkich cech występujących u szczepów klinicznych.

##### 5.1. Otoczka

Otoczka chroni bakterie przed lizą powodowaną przez składniki komplementu, fagocytozą oraz rozpoznanie przez układ immunologiczny. Wydaje się, że wytwarzanie antyfagocytarnej otoczki przez drobnoustroj wewnątrzkomórkowy, jakim jest *F. tularensis*, może utrudniać proces wnikania do komórek gospodarza. Jednak patogen ten potrafi manipulować mechanizmami komórkowymi gospodarza w celu ograniczenia stanu zapalnego i zwiększenia wewnątrzkomórkowej przeżywalności [35].

Otoczka *F. tularensis* tworzy strukturę o grubości około 0,02–0,04  $\mu\text{m}$ . Zbudowana jest z polisacharydu identycznego jak antygen O stanowiący składnik lipopolisacharydu (LPS). Jej wielkość molekularna oszacowana została na 100–250 kDa. W części rdzeniowej zawiera powtórzenia tetrasacharydowe 2-acetamido-2,6-dideoxy-o-glukozy (o-QuiNAc), 4,6-dideoxy-4-formamido-D-glukozy (o-Qui4NFm) i 2-acetamido-2-deoksy-o-galaktrunoamidu (o-GalNAcAN), przy czym liczba jednostek o-GalNAcAN jest dwukrotnie większa niż pozostałych dwóch cukrów [2, 34, 47].

Genami odpowiedzialnymi za wytwarzanie otoczki są *wbtA1*, *wbtA2*, *wbtC*, *wbtI*, *wbtM* oraz *FTL0708*. Pojedyncza delecja *wbtA1*, *wbtA2*, *wbtC*, *wbtI* lub *wbtM* skutkuje utratą zarówno otoczki, jak też antygeny O LPSu, co wskazuje na wspólną ścieżkę biosyntezy antygeny O otoczki i LPSu. Natomiast delecja genu *FTL0708*

powoduje, że otoczka nie jest wytwarzana, ale LPS powstaje normalnie, co wskazuje na istnienie genów specyficznych tylko dla otoczki [2]. Z kolei badania Lindemann i wsp. wykazały, że geny *waaY* i *waaL* są konieczne do wytwarzania otoczki przez szczep Schu S4 [52]. Co ciekawe, *locus capBCA*, homologiczny do genów *cap* *Bacillus anthracis* odpowiedzialnych za wytwarzanie otoczki zbudowanej z kwasu poli-D-glutaminowego u tego drobnoustroju, nie wpływa na zdolność wytwarzania otoczki *F. tularensis*. Ma on jednak istotne znaczenie dla wirulencji ponieważ mutanty *F. tularensis* w *capBCA* lub *capB* są atenuowane zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [2, 78, 86].

## 5.2. Lipopolisacharyd

Lipopolisacharyd (LPS), zwany endotoksyną bakteryjną, jest jednym z bardziej istotnych komponentów większości bakterii Gram-ujemnych, wywierającym duży wpływ na przebieg infekcji. Jest to integralny składnik błony komórkowej, niezbędny do prawidłowego funkcjonowania drobnoustroju, stanowiący ok. 70% jego powierzchni. Oprócz podstawowych funkcji życiowych komórki bakteryjnej LPS jest ważnym czynnikiem chorobotwórczym, który stymuluje układ odpornościowy gospodarza. LPS w swej strukturze posiada lipid A, rdzeń oligosacharydowy oraz O-antygen [34, 94]. Budowa LPS *F. tularensis* posiada wiele unikalnych struktur, wskazujących na jego niską toksyczność: lipid A, który jest asymetryczny, posiada dłuższy łańcuch kwasów tłuszczowych (16–18 węglowych) oraz cztery podstawniki acylowe. Jest niefosforylowany lub monofosforylowany w pozycji 1'. U większości bakterii gram ujemnych lipid A jest sześćoacylowany, a jego łańcuchy są 12–14 węglowymi łańcuchami oraz posiada dwie grupy fosforylowe w pozycji 1' i 4'. Unikalny charakter lipidu A objawia się możliwością jego występowania jako wolny lipid (bez komponentów rdzenia oraz antygeny O [94]. Różnice w budowie lipidu A *F. tularensis* mogą mieć wpływ na zmniejszoną aktywację białek wychytujących LPS oraz aktywność receptora TLR4/MD-2, wywołując tym samym słabszą odpowiedź immunologiczną gospodarza [46]. Badania wykazały, iż LPS drobnoustrojów z gatunku *F. tularensis* spp. *novicida* wywołuje silniejszą odpowiedź immunologiczną niż szczepu LVS stymulując makrofagi do produkcji IL-12 oraz TNFalfa [80].

Antygen O gatunku *F. tularensis* spp. *tularensis* oraz *F. tularensis* spp. *holarctica* zawiera 15 genów kodujących otoczonych transpozazą natomiast *F. tularensis* spp. *novicida* posiada tych genów tylko 12 z czego osiem jest homologicznych z podgatunkiem *F. tularensis* spp. *tularensis*. Trzy geny występujące tylko u *F. tularensis* spp. *holarctica* to *wzy*, *wzx* i *wbt*. Natomiast delecja trzech silnie konserwowanych genów *wbtDEF*

w szczepach *F. tularensis* spp. *novicida* i *F. tularensis* spp. *tularensis* Schu S4 powoduje utratę zdolności do wytwarzania antygeny O i obniżenie patogenności tych szczepów dla myszy. Ale co ciekawe tylko mutanty Schu S4 pozbawione *wbtDEF* utraciły zdolność do wzrostu w mysich makrofagach. Mutanty *F. tularensis* spp. *holarctica* LVS pozbawione *wbtDEF* również nie wytwarzały antygeny O, ale wciąż były w stanie namnażać się w ludzkich makrofagach [78].

Niska aktywność LPS *F. tularensis* w organizmie gospodarza powoduje słabszą odpowiedź immunologiczną i tym samym wpływa na ograniczone rozpoznanie wniknięcia tego drobnoustroju do organizmu człowieka. Dzięki temu *F. tularensis* może przez odpowiedni czas, umożliwiając jej przejście do kolejnych etapów zakażenia, pozostać niezauważona przez organizm gospodarza.

## 5.3. Pili typu IV

Pili typu IV (Tfp) są ważnym czynnikiem wirulencji wielu gram-ujemnych patogenów, w tym także *F. tularensis*. Biorą one udział w adhezji, agregacji komórek bakteryjnych, poruszaniu się, tworzeniu biofilmu, kolonizacji organizmu gospodarza, a także pobieraniu obcego DNA [55, 78, 85]. Obecność pili u *F. tularensis* zaobserwowano po raz pierwszy stosunkowo niedawno, bo w 2004 r. [30].

Klaster genów *Tfp* u podgatunków *F. tularensis* spp. *tularensis*, *F. tularensis* spp. *holarctica* oraz *F. tularensis* spp. *novicida* zawiera 14 genów kodujących białka błony zewnętrznej, białka błony wewnętrznej, ATPazy i podjednostki piliny, czyli białka strukturalne pili. Wykazują one homologię do genów pili typu IV *Neisseria* i *Pseudomonas* [30, 78]. Włókienka pili *F. tularensis* zbudowane jest z 5–6 podjednostek piliny Pile1-Pile6. Wszystkie 6 genów kodujących podjednostki piliny jest obecnych w szczepach *F. tularensis* spp. *tularensis* i *F. tularensis* spp. *novicida*. Szczepy *F. tularensis* spp. *holarctica* zawierają różne mutacje (delecje, skrócenia) w obrębie genów *pile1*, *pile2* lub *pile3*. *Pile4* jest niezbędne do składania pili u wszystkich trzech podgatunków *F. tularensis*. Natomiast rola *Pile5* i *Pile6* w składaniu pili i w wirulencji nie jest poznana [78–79]. Pozostałe geny związane z wytwarzaniem pili typu IV u *F. tularensis* wydają się mieć istotną rolę w wirulencji tych bakterii. Przykładowo, delecja genu białka błony wewnętrznej *pilC* albo delecja genu *pilQ* kodującego białko błony zewnętrznej powoduje atenuację szczepu Schu S4 dla myszy [26]. ATPazy PilF i PilT są wymagane dla wirulencji szczepu LVS u myszy, chociaż PilT nie jest niezbędna dla wirulencji szczepu Schu S4 [26, 76].

Istnieje doniesienie, że Tfp ma udział w sekrecji białek u *F. tularensis* spp. *novicida*. Jednak nie zauważono

tego zjawiska w warunkach *in vitro* u *F. tularensis* spp. *tulatis* i *F. tularensis* spp. *holarctica* [38].

Obecna wiedza w zakresie roli pili typu IV w wirulencji *F. tularensis* jest bardzo niepełna, a jej głębsze zrozumienie dodatkowo komplikuje fakt rozbieżności w nomenklaturze stosowanej przez różnych autorów. Dla przykładu gen *pilE1* określany jest też jako *pilA*, *pilE2* jako *pilE*, *pilE3* jako *pilV*, a *pilO* jako *pilA*.

#### 5.4. Regulator MglA

MglA jest kodowany przez gen *mglA* (macrophage growth locus A) i reguluje transkrypcję genów *F. tularensis* niezbędnych do wewnątrzkomórkowego wzrostu. Gen *mglA* zlokalizowany jest na operonie wraz z genem *mglB*, który również jest niezbędny do wzrostu *F. tularensis* wewnątrz makrofagów [6]. Ekspresja MglA jest indukowana w ciągu 1,5 godziny od wnikięcia bakterii do makrofagów. Po wnikieniu do makrofagów *F. tularensis* ucieka z fagosomu i namnaża się w cytoplazmie makrofaga, a MglA jest niezbędne właśnie do ucieczki z fagosomu [4, 32].

MglA jest pozytywnym regulatorem transkrypcji genów zlokalizowanych na FPI (Francisella Pathogenicity Island), jak również pozytywnym lub negatywnym regulatorem prawie 100 genów zlokalizowanych poza FPI [12].

#### 5.5. Francisella Pathogenicity Island (FPI)

Wyspa patogenności *Francisella* (FPI) ma wielkość 30 kb. Wykazano, że jej obecność jest wymagana do wzrostu *F. tularensis* w makrofagach, a także warunkuje chorobotwórczość tych bakterii dla myszy. FPI zawiera geny *iglABCD*, tworzące operon, oraz geny *pdpABCD* (pathogenicity determinant protein). Sekwencja aminokwasowa IglA i IglB wykazuje 30% homologii do hipotetycznych białek kilku innych gatunków bakterii, z których większość to patogeny zwierząt lub roślin. Ekspresja genu *iglC* jest silnie indukowana po wnikieniu *F. tularensis* do makrofagów, a powstający produkt jest niezbędny do namnażania się tych drobnoustrojów w makrofagach. Sekwencje aminokwasowe IglC i IglD, jak również produktów genów *pdpABCD*, nie wykazują podobieństwa do żadnych znanych białek [31, 33, 63]. Co ciekawe, gen *pdpD* nie występuje w szczepach *F. tularensis* spp. *holarctica*. Natomiast białko PdpD *F. tularensis* spp. *novicida* jest większe o 50 aminokwasów od białka PdpD *F. tularensis* spp. *tularensis*. Ponadto, wirulentne szczepy *F. tularensis* spp. *tularensis* i *F. tularensis* spp. *holarctica* posiadają w genomie dwie identyczne kopie FPI [4, 63]. Dotychczas jednym czynnikiem patogenności występującym w wysoce zjadliwych szczepach *F. tularensis* spp. *tularensis* a nie występującym w szczepach *F. tularensis* spp. *tularen-*

*sis*, które mają znacząco mniej patogenne dla ludzi, jest gen *pdpD*. Ale co zaskakujące, mutant *pdpD* *F. tularensis* spp. *novicida* wykazywał mniejszą wirulencję dla myszy niż szczep LVS, który również pozbawiony jest tego genu. Może to być efektem duplikacji FPI w szczepie LVS i tym samym większej ilości produktów genów FPI, co może kompensować brak *pdpD* [63]. Geny znajdujące się w obrębie FPI odgrywają rolę w sekrecji białek, co zostało przedstawione w dalszej części pracy.

#### 5.6. Białka błony zewnętrznej

Białka błony zewnętrznej (OMP) są istotnym elementem strategii inwazyjnej bakterii po wnikieniu do komórek gospodarza, ułatwiają wewnątrzkomórkowy rozwój i mają wpływ na wirulencję. Dotychczas tylko dla części OMP *F. tularensis* wykazano rolę w wirulencji. Do najwcześniej opisanych należy białko Tul4 o wielkości 17 kDa. Stymuluje ono proliferację limfocytów T, głównie receptorów CD4, produkcję IL-2 oraz IFN- $\gamma$ . Brak genu *Tul4* hamuje wewnątrzkomórkowy wzrost szczepu LVS *F. tularensis* [42, 63, 82]. Z kolei lipoproteina Flpp3 stymuluje TLR2 i jest wymagana do przeżycia szczepu LVS w płucach myszy [78].

Białko DipA warunkuje wirulencję szczepu Schu S4 *in vivo* i *in vitro*. Razem z FopA tworzy kompleks w błonie zewnętrznej [18]. OmpA wymagane jest do replikacji w makrofagach. Jego delecja powoduje wzrost produkcji cytokin (m.in. TNF- $\alpha$  i IL-6) przez makrofagi. Co więcej, białko to wpływa na morfologię komórki bakteryjnej oraz zwiększenie przeżywalności bakterii [4, 76]. FupA (YapH-N, FopC) to 58 kDa białko niezbędne do wirulencji *in vivo* i *in vitro*. Mutanty w tym genie są bardziej wrażliwe na zabijanie przez makrofagi indukowane IFN- $\gamma$ . Odgrywa również istotną rolę w sideroforozeależnych i sideroforoniezaależnych mechanizmach pozyskiwania żelaza [78]. FslE (SrfA) jest drugim białkiem OMP, które odgrywa rolę w pobieraniu żelaza. Wykazano, że jego obecność jest kluczowa dla wzrostu szczepu Schu S4 w warunkach niedoboru żelaza, ale nie do wzrostu szczepu LVS. Ekspresja tego białka wzrasta przy ograniczonym dostępie żelaza w środowisku. Rola FslE w wirulencji polega na synergistycznym działaniu z białkiem FupA [74]. Kolejne białko – DsbA (FipB), zlokalizowane u innych bakterii periplazmatycznie, u *F. tularensis* umiejscowione jest nietypowo w błonie zewnętrznej. Jest niezbędne do wewnątrzkomórkowego przeżycia bakterii, ucieczki z fagosomu i wirulencji dla myszy [72]. Z kolei OMP FsaP pełni istotną rolę w przyleganiu szczepu LVS do komórek nabłonkowych. Wykazuje 98% homologię z podobnym białkiem w szczepie Schu S4. Natomiast u *F. tularensis* spp. *novicida* w części sygnałnej tego białka występuje substytucja aminokwasowa co wpływa na umiejscowienie i funkcję

tego białka, które w tym przypadku nie jest zlokalizowane w błonie zewnętrznej [58].

Wśród innych białek błony zewnętrznej, które mogą mieć znaczenie w wirulencji *F. tularensis* wymienia się FopA, IglE i TolC [44, 78]. OMP są obecnie intensywnie badane nie tylko ze względu na ich rolę w patogenezie, ale także ze względu na ich potencjalną przydatność jako składnik antygenowy szczepionki przeciw tularemii, nad stworzeniem której trwają prace od wielu lat.

### 5.7. Białka wydzielnicze i systemy sekrecji

System sekrecji w komórkach bakteryjnych służy przede wszystkim wydzielaniu cząstek molekularnych oraz białek poza komórkę bakteryjną co stanowi niezbędny mechanizm adaptacji oraz przeżycia w środowisku zewnętrznym a przede wszystkim w komórkach gospodarza. Niewiele wiadomo o molekularnych mechanizmach systemu sekrecji *F. tularensis*. Jest on powiązany z wirulencją oraz zdolnością do replikacji wewnątrz makrofagów komórek gospodarza. [5] Co ciekawe, badania wykazały brak u *F. tularensis* systemu sekrecji typu III oraz IV, których kluczową funkcją u innych patogenów bakteryjnych jest wprowadzanie białek efektorowych do komórek gospodarza umożliwiających zakażenie i rozwój choroby [40].

Sekrecja białek związanych z wirulencją *F. tularensis* związana jest ze wspomnianą wcześniej wyspą patogenności FPI, której część genów (m.in. *iglA*, *iglB*, *pdpB*, *dotU*, i *vgrG*) wykazuje homologię z VI typem systemu sekrecji T6SSs [10–11, 14]. System sekrecji typu VI *F. tularensis* zbudowany jest z zewnętrznego futerału utworzonego z heterodimerów IglA/IglB ułożonych w postaci helikalnego cylindra. Wewnątrz znajduje się rurka utworzona przez IglC, która prawdopodobnie przemieszczana jest do błony komórki docelowej na skutek kurczenia się futerału IglA/IglB. VgrG jest zlokalizowane na końcu T6SS tworząc strukturę przebijającą komórkę gospodarza. Struktura rurki i futerału jest umocowana w błonie zewnętrznej za pomocą lipoproteiny IglE, która oddziałuje także z białkami PdpB i DotU zlokalizowanymi w błonie wewnętrznej tworząc kanał periplazmatyczny [21, 78]. Wykazano, że mutacja w genach *IglA* oraz *IglB* uniemożliwia *F. tularensis* ucieczkę z fagosomu i wewnątrzkomórkowy wzrost [13]. Pomimo licznych badań rola systemu sekrecji typu VI w wirulencji *F. tularensis* pozostaje kontrowersyjna.

Wiele białek *F. tularensis* jest wydzielanych na zewnątrz komórki bakteryjnej, ale mechanizm ich sekrecji pozostaje nieznany. Wśród wydzielanych czynników wirulencji wymienić należy kwaśną fosfatazę AcpA, katalazę-peroksydazę KatG, symutazę nadtlenu SodB. AcpA jest związane z błoną zewnętrzną lub wydzielane do supernatantu hodowli szczepów LVS i *F. tularensis* spp. *novicida*. Było również izolowane z cytozolu zain-

fekowanych makrofagów, co sugeruje rolę tego białka w wirulencji. Oprócz aktywności kwaśnej fosfatazy białko AcpA *F. tularensis* posiada aktywność fosfolipazy i lipazy, hamuje wybuch tlenowy neutrofilii, odgrywa rolę w wewnątrzkomórkowym wzroście, ucieczce z fagosomu i zjadliwości dla zwierząt [23, 60]. KatG odgrywa rolę w neutralizacji aktywnego tlenu i azotu w szczepach LVS i Schu S4. Jednakże nie jest niezbędny do wewnątrzkomórkowego przeżywania w makrofagach obydwu tych szczepów. Wykazano jego rolę w wirulencji LVS dla myszy [53]. Niewiele jest badań dotyczących roli SodB w wirulencji *F. tularensis*. Te nieliczne wskazują na udział tego białka w oporności bakterii na nadtlenu oraz w zjadliwości szczepu LVS dla myszy [3].

## 6. Podsumowanie

*F. tularensis* jest patogenem znanym od ponad 100 lat jednak wciąż niewiele wiadomo o czynnikach wirulencji tego drobnoustroju oraz o patogenezie tularemii. Pomimo niewielkich różnic na poziomie genomu podgatunku *F. tularensis* znacząco różnią się patogennością dla ludzi i zwierząt. Badania pokazują, że zidentyfikowane u jednego podgatunku funkcje pewnych genów i białek – potencjalnych czynników zjadliwości, mogą pełnić zupełnie odmienne funkcje u innego podgatunku. Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że większość badań prowadzona jest na szczepach o obniżonej zjadliwości. Przedstawione w niniejszej pracy czynniki zjadliwości *F. tularensis* z całą pewnością nie wyczerpują tematu. Co więcej, potrzeba jeszcze wielu badań, aby w pełni ustalić ich funkcję u każdego z podgatunków *F. tularensis*.

### Podziękowania

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer 2013/11/N/NZ/6/01247.

### Piśmiennictwo

1. Anda P., Martínez Nawarro J.F i wsp.: Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 575–582 (2001)
2. Apicella M.A., Gibson B.W. i wsp.: Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. *PLoS ONE*, **5**, e11060 (2010)
3. Bakshi C.S., Malik M., Regan K., Melendez J.A., Metzger D.W., Pavlov V.M., Sellati J.S.: Super oxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hyper sensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J. Bacteriol.* **188**, 6443–6448 (2006)
4. Barker J.R., Klose K.E.: Molecular and genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis*. *Ann. NY Acad. Sci.* **1105**, 138–159 (2007)

5. Barker J.R., Chong A., Wehrly T.D., Yu J.J., Rodriguez S.A., Liu J., Celli J., Arulanandam B.P., Klose K.E.: The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. *Mol. Microbiol.* **74**, 1459–1470 (2009)
6. Baron G.S., Nano F.E.: MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol. Microbiol.* **29**, 247–259 (1998)
7. Baumann-Popczyk A., Sadkowska-Todys M., Zieliński A.: Choroby zakaźne i pasożytnicze-epidemiologia i profilaktyka. Wyd. VII, 2014, Lublin
8. Bernard K., Tessier S., Winstanley J., Chang D., Borczyk A.: Early recognition of atypical *Francisella tularensis* strains lacking a cysteine requirement. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 551–553 (1994)
9. Brevik O.J., Ottem K.F., Kamaishi T., Watanabe K., Nylund A.: *Francisella halioticida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* **5**, 1044–1056 (2011)
10. Broms J.E., Meyer L., Sun K., Lavander M., Sjöstedt A.: Unique substrates secreted by the type VI secretion system of *Francisella tularensis* during intramacrophage infection. *PLoS One*, **7**, (2012)
11. Bröms J.E., Sjöstedt A., Lavander M.: The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. *Front. Microbiol.* **1**, 136 (2010)
12. Brotcke A., Weiss A.D., Kim C.C., Chain P., Malfatti S., Garcia E., Monack D.M.: Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* **74**, 6642–6655 (2006)
13. Bruin O.M., Duplantis B.N., Ludu J.S., Hare R.F., Nix E.B., Schmerk C.L., Robb C.S., Boraston A.B., Hueffer K., Francis E.: The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IglA, IglB, IglC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology*, **157**, 3483–3491 (2011)
14. Bruin O.M., Ludu J.S., Nano F.E.: The *Francisella* pathogenicity island protein IglA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth. *BMC Microbiology*, **7**, doi:10.1186/1471-2180-7 (2007)
15. Carvalho C.L., Lopes de Carvalho L., Zé-Zé L., Nuncio M.S., Duarte E.L.: Tularaemia: A challenging zoonosis. *Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 85–96 (2014)
16. Centers for Disease Control and Prevention: Emergency Preparedness and Response, <http://emergency.cdc.gov/bioterrorism/overview.asp> (20.02.2017)
17. Champion M.D., Galagan J i wsp.: Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.* **5**, e1000459 (2009)
18. Chong A., Child R., Wehrly T.D., Rockx-Brouwer D., Qin A., Mann B.J., Jean C. Structure-function analysis of DipA a virulence factor required for intracellular replication. *PLoS One*, **8**, e67965 (2013)
19. Clemens D. L., Lee B.Y., Horwitz M.A.: Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect. Immun.* **72**, 3204–3217 (2004)
20. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A.: *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect. Immun.* **73**, 5892–5902 (2005)
21. Clemens D.L., Ge P., Lee B.Y., Horwitz M.A., Zhou Z.H.: Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. *Cell*, **160**, 940–951 (2015)
22. Corey A. Dillaha T. and J.A.: *Francisella tularensis* endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 399–400 (2000)
23. Dai S., Mohapatra N.P., Schlesinger L.S., Gunn J.S.: The acid phosphatase AcpA is secreted *in vitro* and in macrophages by *Francisella* spp. *Infect. Immun.* **80**, 1088–1097 (2012)
24. Dennis D.T., Tonat K.: Tularemia as a biological weapon: medical and public management. *JAMA*, **285**, 2763–2773 (2001)
25. Formińska K., Zasada A.A., Rastawicki W., Śmietańska K., Bander D., Wawrzynowicz-Syczewska M., Yanushevych M., Niścigórska-Olsen J., Wawszczak M.: Increasing role of arthropod bites in tularemia transmission in Poland – case reports and diagnostic methods. *Ann. Agric. Environ. Med.* **22**, 443–6 (2015)
26. Forslund A.L., Salomonsson E.N., Golovliov I., Kuoppa K., Michell S., Titball R., Oyston P., Noppa L., Sjöstedt A., Forsber A.: The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis subspecies tularensis*. *BMC Microbiol.* **10**, 227 (2010)
27. Francis E., M.D., Moore D. M.D.: Identity of Ohara's disease and tularemia. *JAMA*, **86**, 1329–1332 (1926)
28. Franke J., Fritzsche J., Tomaso H., Straube E., Dorn W., Hildebrandt A.: Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6929–6836 (2010)
29. Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G.: Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systemic bacteriology, wyd. 2, Springer, New York, 2004
30. Gil H., Benach J.L., Thanassi D.G.: Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* **72**, 3042–3047 (2004)
31. Golovilov I., Baranov Z., Krocova., Kovarova H., Sjöstedt A.: An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect. Immun.* **71**, 5940–5950 (2003)
32. Golovliov I., Ericsson M., Sandstrom G., Tarnvik A., Sjöstedt A.: Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infect. Immun.* **65**, 2183–2189 (1997)
33. Gray C. G., Cowley S.C., Cheung K.K., Nano F.E.: The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 53–56 (2002)
34. Gun J.S., Ernst R.K.: The structure and function of *Francisella* Lipopolysaccharide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1105**, 202–218 (2007)
35. Gunnell M.K., Robison R.A., Adams B.J.: Natural selection in virulence genes of *Francisella tularensis*. *J. Mol. Evol.* **82**, 264–278 (2016)
36. Gürcan S.: Epidemiology of tularemia. *Balkan Med. J.* **31**, 3–10 (2014)
37. Hodges L., Penn R.L.: Tularemia and bioterrorism. *JAMA*, **21**, 285 (2001)
38. Hager A.J., Bolton D.L., Pelletier M.R., Brittnacher M.J., Gallagher L.A., Kaul R., Skerrett S.J., Miller S.I., Guina T.: Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol. Microbiol.* **62**, 227–237 (2006)
39. Hanke C.A., Otten J.E., Berner R., Serr A., Spletstoesser W., Schnakenburg C.: Ulceroglandular tularemia in a toddler in Germany after a mosquito bite. *Eur. J. Pediatr.* **168**, 937–940 (2009)
40. Hare R.F., Hueffer K.: *Francisella novicida* pathogenicity island encoded proteins were secreted during infection of macrophage-like cells. *Plos One*, **9**, (2014) e105773
41. Hauri A.M., Hofstetter I., Seibold E., Kaysser P., Eckert J., Neubauer H., Spletstoesser W.D.: Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 238–224 (2010)
42. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Kämpfer P., Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V.: Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 561–574 (2007)

43. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Kamper P., Spletstoessem W.D.: Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolates from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *Novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **60**, 1887–1896 (2010)
44. Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V.: Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane eproteins. *J. Bacteriol.* **189**, 561–574 (2007)
45. Jaohansson A., Keim P.: Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple – locus variable – number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* **17**, 5808–5818 (2004)
46. Johansson A., Petersen J.M.: Genotyping of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *J. AOAC Int.* **93**(6), 1930–1943 (2010)
47. Jones B.D., Faron M., Rasmussen J.A., Fletcher J.R.: Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**(4), 2014
48. Kłapeć T., Cholewa A.: Tularemia – wciąż groźna zoonoza. *MONZ*, **3**, 155–160 (2011)
49. Larson M.A., Nalbantoglu U., Sayood K., Zent E.B., Cer R.Z., Iwen P.C., Francesconi S.C., Bishop-Lilly K.A., Mokashi V.P., Sjöstedt A., Hinrichs S.H.: Reclassification of *Wolbachia persica* as *Francisella persica* comb. nov. and emended description of the family Francisellaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 1200–1205 (2016)
50. Larson M.A., Fey P.D., Hinrichs S.H., Iwen P.C.: *Francisella tularensis* bacteria associated with feline tularemia in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **20**(12), 2068–2071 (2014)
51. Leelaporn A., Yongyod S., Limsrivanichakorn S., Yungyuen T., Kiratisin P.: Emergence of *Francisella novicida* bacteremia, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* **14**(12), 1935–1937 (2008)
52. Lindemann S.R., Peng K., Long M.E., Hunt J.R., Apicella M.A., Monack D.M., Allen L.A., Jones B.D.: *Francisella tularensis* SchuS4O-antigen and capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages. *Infect. Immun.* **79**, 581–594 (2011) doi:10.1128/IAI.00863-10
53. Lindgren H., Shen H., Zingmark C., Golovliov I., Conlan W., Sjöstedt A.: Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect. Immun.* **75**, 1303–1309 (2007)
54. Mahawar M., Atianand M.K., Dotson R.J., Mora V., Rabadi S.M., Metzger D. W., Huntley J.F., Harton J.A., Malik M., Bakshi C.S.: Identification of a novel *Francisella tularensis* factor required for intramacrophage survival and subversion of innate immune response. *J. Biol. Chem.* **287**, 25216–25229 (2012)
55. Marrs C.F., Weir S.: Pili (fimbriae) of *Branhamella* species. *Am. J. Med.* **14**, 36–40 (1990)
56. May C. Chu., Carey R.B., Welch D.F.: Basic protocols for level a laboratories. For the presumptive identification of *Francisella tularensis*. Centers for Disease Control and Prevention.
57. Meldunki epidemiologiczne NIZP-PZH, [http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index\\_p.html](http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html) (07.02.2017)
58. Melillo A., Sledjeski D.D., Lipski S., Wooten R.M., Basrur V., Lafontaine E.R.: Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **263**, 102–108 (2006)
59. Mierzyńska D., Hermanowska-Szpakowicz T.: Tularemia jako potencjalna broń bioterrorystów. *Med. Pr.* **53**, 279–281 (2002)
60. Mohapatra N.P., Balagopal A., Soni S., Schlesinger L.S., Gunn J.S.: AcpA is a *Francisella* acid phosphatase that affects intramacrophage survival and virulence. *Infect. Immun.* **75**, 390–396 (2007)
61. Monike L van Hoek.: Biofilms an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence*, **4**, 8, 833–846 (2015)
62. Moniuszko A., Zajkowska J., Pancewicz S. i wsp.: Arthropod-Borne Tularemia In Poland: A Case Report. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**, 1399–1401 (2011)
63. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.M., Roberts M.J., Ludu J.S., Letendre G.W., Meierovics A.I., Stephens G., Elkings K.L.: A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.* **186**, 6430–6436 (2004)
64. Nano F.E., Schmerk C.: The *Francisella* pathogenicity island. *Ann. NY Acad. Sci.* **1105**, 122–137 (2007)
65. Nano F.E.: Identification of a heat-modifiable protein of *Francisella tularensis* and molecular cloning of the encoding gene. *Microb. Pathogenesis.* **5**, 109–119 (1988)
66. Nordstoga A., Handeland K., Johansen T.B., Iversen L., Gaviere-Widén D., Mattsson R., Wik-Larssen K., Afset J.G., Næverdal R., Lund A.: Tularemia in Norwegian dogs. *Vet. Microbiol.* **10**, 318–322 (2014)
67. Olsufjew N., Meshcheryakova I.S.: Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 872–874 (1983)
68. Ottem K.F., Nylund A., Karlsbakk E., Friis-Møller A., Krossøy B., Knappskog B.: New species in the genus *Francisella* (*Gammaproteobacteria*; *Francisellaceae*); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). *Arch. Microbiol.* **188**, 547–550 (2007)
69. Pechous R.D., McCarthy T.R., Zahrt T.C. Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 684–711 (2009)
70. Pierini L.M.: Uptake of serum-opsonized *Francisella tularensis* by macrophages can be mediated by class A scavenger receptors. *Cell. Microbiol.* **8**, 1361–1370 (2006)
71. Pilo P., Johansson A., Frey J.: Identification of *Francisella tularensis* Cluster in Central and Western Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 2049–2051 (2009)
72. Qin A., Scott D.W., Thompson J.A., Mann B.J.: Identification of an essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* virulence factor. *Infect. Immun.* **77**, 152–161 (2009)
73. Qu P.H., Chen S.Y., Scholz H.C., Busse H.J., Gu Q., Kämpfer P., Foster J.T., Glaeser S.P., Chen C., Yang Z.C.: *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3628–3635 (2013)
74. Ramakrishnan G., Sen B., Johnson R.: Paralogueous outer membrane proteins mediate uptake of different forms of iron and synergistically govern virulence in *Francisella tularensis tularensis*. *J. Biol. Chem.* **287**, 25191–25202 (2012)
75. Reye A.L., Hübschen J.M., Sausy A. i wsp.: Prevalence and seasonality of Tick-Borne pathogens in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from Luxembourg. *Appl. Environ. Microbiol.* **9**, 2923–2931 (2010)
76. Robertson G.T., Case E.D., Dobbs N., Ingle C., Balaban M., Celli J., Norgard M.V.: FTT0831c/FTL\_0325 contributes to *Francisella tularensis* cell division maintenance of cell shape, and structural integrity. *Infect. Immun.* **82**, 2935–2948 (2014)
77. Rohmer L., Brittnacher M.J. i wsp.: Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. *Genome Biol.* **8**, (2007)
78. Rowe H.M., Huntley J.F.: From the outside-in: the *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 1–20 (2015)
79. Salomonsson Näslund E., Forslund A.L., Forsberg Å.: Type IV pili in *Francisella* – a virulence trait in an intracellular pathogen. *Front. Microbiol.* **2**, 29 (2011)
80. Sandström G., Sjöstedt A., Johansson T., Kuoppa K., Williams J.C.: Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide



- from *Francisella tularensis* LVS. *FEMS Microbiol. Immunol.* **105**, 201–210 (1992)
81. Schulert G.S., Allen L.A.: Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 563–571 (2006)
  82. Sjöstedt A., Sandström G., Tärnvik A., Jaurin B.: Nucleotide sequence and T cell epitopes of a membrane protein of *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* **145**, 311–317 (1990)
  83. Spletstoesser W.D., Piechotowski I., Buckendahl A., Frangoulidis D., Kaysser P., Kratzer W., Kimmig P., Seibold E., Brockmann S.O.: Tularemia in Germany: the tip of the iceberg? *Epidemiol. Infect.* **137**, 736–743 (2009)
  84. Schmidt H., Hensel M.: Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 14–56 (2004)
  85. Strom M.S., Lory S.: Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 565–596 (1993)
  86. Su J., Yang J., Zhao D., Kawula T.H., Banas J.A. and Zhang J.R.: Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect. Immun.* **75**, 3089–3101 (2007)
  87. Surveillance Report Annual epidemiological report. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. ECDC, 2011
  88. Svensson K., Johansson A. i wsp.: Genome sequence of *Francisella tularensis* subspecies holarctica strain FSC200, isolated from a child with tularemia. *J. Bacteriol.* **194**, 6965–6966. (2012)
  89. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Bystrom M., Forsman M., Johansson A.: Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* **187**(11), 3903–3908 (2005)
  90. Tomaso H., Scholz H.C., Naubauer H., Al Dahouk S., Seibold E., Landt O., Forsman M., Spletstoesser W.D.: Real-time PCR using hybridization probes for rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol. Cell. Probes.* **21**, 12–16 (2007)
  91. Versage J.L., Severin D.D.M., Chu M.C., Petersen J.M.: Development of multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5492–5499 (2003)
  92. Vogler A.J., Keim P.: Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* **191**, 2474–2484 (2009)
  93. Vogler AJ, Keim P. i wsp.: Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* **191**, 2474–2484 (2009)
  94. Wang X., Ribeiro A.A., Guan Z., Abraham S.M., Raetz C.R.H.: Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4136–4141 (2006)
  95. Whipp M.J., Davis J.M., Lum G., De Boer J., Zhou J.Y., Bearden S.W., Petersen J.M., Chu M.C., Hogg G.: Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* **52**, 839–842 (2003)

Anna Paliwoda<sup>1\*</sup>, Adriana Nowak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,  
Politechnika Łódzka

Wpłynęło w październiku 2016 r.  
Zaakceptowano w styczniu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Etapy adhezji bakterii *Lactobacillus* do nabłonka jelitowego. 3. Czynniki uczestniczące w adhezji. 3.1. Czynniki białkowe. 3.2. Czynniki niebiałkowe. 3.3 Czynniki środowiskowe. 3.4. Tworzenie agregatów oraz oddziaływania hydrofobowe. 4. Podsumowanie

#### Factors determining the adhesive capacity of *Lactobacillus* bacteria

**Abstract:** The ability of *Lactobacillus* to adhere to the intestinal epithelium is one of the most important criterion in the selection of probiotic strains. Adherence allows microorganisms to survive and temporarily colonize the digestive system, which is necessary to induce beneficial effects on the host. Adhesion is a very complex, multistep process and, although there are many proposed theories, the exact mechanism is still not fully understood. A crucial role in the formation of the adhesive interactions plays the bacterial cell wall and its components, such as exopolisaccharides, lipoteichoic acids and various proteins e.g. S-layer proteins.

1. Introduction. 2. Stages of *Lactobacillus* adhesion to intestinal epithelium 3. Adhesion factors. 3.1. Protein factors 3.2. Non-protein factors. 3.3. Environmental factors. 3.4. Aggregation and hydrophobic interactions. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** adhezja, bakterie mlekowe, *Lactobacillus*  
**Key words:** adhesion, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*

## 1. Wstęp

Zjawisko adhezji stanowi istotny proces dla przeżycia i namnażania się bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym. Uważa się, że sam pasaż przez przewód pokarmowy nie jest wystarczający do wywołania efektu zdrowotnego [24]. Z uwagi na to, że adhezja bakterii do nabłonka jelitowego wpływa na czas ich przebywania w układzie pokarmowym, zdolność ta jest uważana za ważne kryterium podczas selekcji szczepów probiotycznych [29]. Proces ten stanowi pierwszy krok w wykształcaniu interakcji pomiędzy drobnoustrojami, a komórkami gospodarza [60]. Podczas przebywania probiotyków w jelitach, mikroorganizmy te mogą wpływać na miejscowy skład mikrobioty oraz stymulować układ odpornościowy.

Adhezja to proces umożliwiający mikroorganizmom przyleganie do innych komórek lub powierzchni. Struktury umiejscowione na powierzchni komórek mikroorganizmów mają bezpośredni wpływ na ten proces. Egzopolisacharydy (EPS) i białkowe wypustki uczestniczą w tworzeniu wiązań między komórką a powierzchnią. EPS odgrywają istotną rolę podczas formowania struktur biofilmu, natomiast białka powierzchniowe działają jak adhezyjne i są niezbędne do wytworzenia początkowych oddziaływań [21]. Adhezja jest procesem wieloetapowym. W pierwszym etapie, gdy odległość komórki od powierzchni jest duża, siłą napędową tego

procesu są oddziaływania hydrofobowe. W kolejnym etapie (gdy odległość między bakterią, a powierzchnią jest mniejsza niż 1,5 nm) dzięki obecności glikopolimerów na powierzchni komórek (np. kwas tejchojowy) dochodzi do rozpoznania odpowiednich receptorów i związania z bakteryjnymi lektynami. Wraz z upływem czasu, wiązania te ulegają modyfikacji, aby zwiększyć siłę adhezji [3, 53]. Struktura powierzchni komórek bakterii z rodzaju *Lactobacillus* umożliwia im adhezję i tworzenie biofilmów na różnych powierzchniach. Osłony komórkowe bakterii Gram-dodatnich stanowią platformę, na której znajdują się polisacharydy otoczkowe, kwasy tejchojowe i lipoteichojowe, białka powierzchniowe i lipoproteiny [52]. Niektóre gatunki pałeczek kwasu mlekowego posiadają na powierzchni dodatkowo warstwę białek zwaną warstwą S (*S-layer proteins*) [51]. Udowodniono, że te elementy prezentowane na osłonach komórkowych bakterii wpływają na hydrofobowość oraz zdolność autoagregacji szczepów *Lactobacillus* [57].

Warstwa mureiny w ścianie komórkowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest zbudowana z łańcuchów polisacharydów składających się z podjednostek kwasu muraminowego i N-acetyloglukozaminy, które są połączone wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym. Całość stabilizują i utrzymują krótkie peptydy [6]. Kwasy tejchojowe mogą stanowić do 50% suchej masy ściany komórkowej. Są one zaangażowane w wiele funkcji ściany

\* Autor korespondencyjny: Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź; e-mail: aniaogr@onet.eu

komórkowej. Wraz z warstwą peptydoglikanu tworzą polianionową matrycę i przyczyniają się do porowatości i elastyczności błony komórkowej. Biorą także udział w regulacji poziomu kationów [26].

Egzopolisacharydy (EPS) połączone ze ścianą komórkową mogą wykazywać charakter kwaśny lub neutralny. Niektóre z nich mogą być także wydzielane do środowiska. Z uwagi na ich dużą ilość na powierzchni komórki w znacznym stopniu decydują one o jej właściwościach [6]. Egzopolisacharydy są otoczone przez zewnętrzną warstwę białek warstwy S. Są one przymocowane do ściany komórkowej wiązaniami kowalencyjnymi (białka LPXTG) lub niekowalencyjnymi (poprzez domeny LysM, SH3, WXL), a także poprzez N- lub C-końcowe helisy transmembranowe [51].

Czynniki wiążące, zwane adhezynami, u bakterii *Lactobacillus* mogą być klasyfikowane według [61]: ich docelowych miejsc w błonie śluzowej jelit, z którymi się łączą na przykład komponenty warstwy śluzowej lub zewnątrzkomórkowe matryce; lokalizacji na powierzchni komórki np. białka warstwy S, a także sposobu przymocowania do powierzchni komórki np. białka zależne od sortazy.

Adhezyny mają charakter białkowy i znajdują się w największej ilości na powierzchni fimbrii oraz na zewnętrznej warstwie ściany komórkowej [10]. Struktura ściany komórkowej bakterii odpowiada za niespecyficzne oddziaływanie pomiędzy drobnoustrojami, a otaczającym je środowiskiem [11].

## 2. Etapy adhezji bakterii *Lactobacillus* do nabłonka jelitowego

Proces adhezji mikroorganizmów jest procesem wielostopniowym. Do opisu tego zjawiska została wykorzystana teoria DLVO, według której, całkowite oddziaływanie między powierzchnią a komórką jest sumą oddziaływań przyciągających van der Waalsa oraz odpychających oddziaływań elektrostatycznych, które są związane z powstawaniem podwójnej warstwy elektronowej wokół komórki. Siły te decydują o zbliżeniu się bakterii do powierzchni. Przyciąganie komórki do powierzchni zachodzi w obszarze dwóch minimum energetycznych. Najsilniejsze występuje w tzw. pierwszym minimum (znajdującym się w odległości ok. 1 nm od powierzchni). Jest ono oddzielone od drugiego minimum obszarem dodatniej energii wywołującej odpychanie [10,21]. Ważną rolę w tworzeniu biofilmu przez drobnoustroje odgrywają wytwarzane przez nie polimery zewnątrzkomórkowe, białka ściany komórkowej oraz struktury zewnątrzkomórkowe (rzęski i fimbrie). W pierwszym etapie adhezji bakterii, gdzie odległość między komórkami, a zajmowaną powierzchnią jest dość duża, najistotniejszą rolę odgrywają oddzia-

ływania fizyczne związane z siłami grawitacyjnymi, hydrofobowymi, van der Waalsa i termodynamicznymi. Umożliwiają one zbliżenie się komórki do zasiedlanego miejsca [27]. Na tym etapie ważną rolę odgrywają także fimbrie lub rzęski. Dzięki fimbriom komórki łatwiej mogą pokonać siły odpychania między ścianą komórkową bakterii, a zasiedlaną powierzchnią. Natomiast dzięki rzęskom bakterie mogą łatwiej dotrzeć do powierzchni oraz innych mikroorganizmów w celu wytworzenia nowej mikrokoloni [56]. Kolejny etap adhezji zachodzi w momencie gdy odległość między komórką a powierzchnią jest mniejsza niż 1,5 nm [41]. Dochodzi wtedy do wytworzenia specyficznych połączeń między zasiedlaną powierzchnią, a adhezynami na powierzchni bakterii (np. pile, polimery polisacharydowe) [17]. Mechanizmy rozpoznawania i wytworzenia tych połączeń są bardzo różne. Jest to spowodowane dużą różnorodnością powierzchniowych elementów komórki u różnych szczepów *Lactobacillus*, a także różnym sposobem ich połączeń ze ścianą komórkową [51]. Białka uczestniczące w procesie adhezji mogą być także kodowane w plazmidach bakteryjnych. Posiadanie takiego plazmidu przez dowolną bakterię znacznie ułatwia kolonizację jelit oraz zapewnia przewagę konkurencyjną w stosunku do innych mikroorganizmów, w tym chorobotwórczych. Wykazano, że usunięcie plazmidu pLOCK 0919 ze szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0919 skutkowało zanikiem hydrofobowości, znacznym obniżeniem zdolności adhezyjnych szczepu [1].

W procesie adhezji drobnoustrojów do nabłonka jelitowego ważną rolę odgrywa warstwa śluzu. Jest to mieszanina glikoprotein (tzw. mucyn) i glikolipidów, która tworząc żel, otacza i ochrania komórki nabłonka. Mucyny są zwykle produkowane przez wyspecjalizowane komórki śluzowe w tkankach gruczołowych oraz przez komórki kubkowe układu pokarmowego [13]. Warstwa śluzu tworzy miejsce przyczepu oraz źródło składników odżywczych dla bakterii kwasu mlekowego [35]. Jeden z proponowanych mechanizmów interakcji pomiędzy mikrobiotą, a organizmem gospodarza jest związany z występowaniem dwóch miejsc: pierwszym odpowiedzialnym za związanie oligosacharydowej części mucyn obecnych w warstwie śluzu z powierzchnią komórki bakteryjnej oraz drugim, związanym z przyleganiem szczepów do warstwy śluzu [53]. Zjawisko przyłączenia bakterii do warstwy mucyn nazywane jest adhezją z glikoniugatami jelitowymi [60]. Warstwa śluzu, dzięki swej lepkości, umożliwia przyczepienie się komórek bakterii. Właściwości te są wynikiem obecności rozległych regionów w rdzeniu mucyn zawierających reszty siarczanowe wiążące regiony bogate w cysteinę. Oligosacharydy występujące w mucynach tworzą końce stanowiące miejsce wiązania z komórkami bakterii [33]. Zaobserwowano, że pewne szczepy *Lactobacillus* wykazują zdolność do adhezji do

antygenów grupy krwi ABO, które zawierają terminalne nieredukujące łańcuchy polisacharydowe mucyn. Ponadto, również łańcuchy polisacharydowe zawierające reszty kwasu sjałowego i grupy siarczanowe zwiększają adhezję *Lactobacillus* sp. do mucyn [38].

### 3. Czynniki uczestniczące w adhezji

Czynniki wpływające na proces adhezji bakterii *Lactobacillus* sp. można podzielić na białkowe, niebiałkowe, środowiskowe, zdolność agregacji oraz hydrofobowość.

#### 3.1. Czynniki białkowe

Białka wytwarzane przez bakterie mogą przyczyniać się do utrzymania homeostazy w układzie pokarmowym gospodarza za pomocą kilku mechanizmów. Niektóre białka są odpowiedzialne za adhezję bakterii do nabłonka jelita, inne stymulują układ immunologiczny oraz mogą wpływać na ekspresję genów kodujących białka biorące udział w komunikacji między komórkami gospodarza, a drobnoustrojami [47].

Białka związane ze ścianą komórkową bakterii należą do najlepiej poznanych i scharakteryzowanych [39]. Czynniki te, zwane adhezynami, zaklasyfikowano według ich struktury i funkcji do kilku grup (Tabela I): białka warstwy S (SLPs), białka wiążące mucyny (MUBs), białka zależne od sortazy (SDPs), białka mannozo-specyficzne (MSAs) oraz białka pośredniczące w adhezji do składników macierzy międzykomórkowej enterocytów oraz

wiele innych słabiej poznanych [51]. Roos i Jonsson [45] badając homologię białek MUBs i MSAs sugerują, że istnieje kilka podobieństw w strukturze tych białek. Jedną z nich jest obecność N-końcowego peptydu sygnałowego, za pomocą którego białko jest kierowane do szlaku sekrecyjnego [6]. Drugim podobieństwem jest obecność motywu LPXTG na C-końcu, który jest rozpoznawany przez peptydazy powierzchniowe z rodziny sortaz, które katalizują rozerwanie wiązania między treoniną a glicyną, a następnie w sposób kowalencyjny wiążą białko z warstwą peptydoglikanu [47]. Dodatkowo w skład macierzy zewnątrzkomórkowej otaczającej enterocyty, wchodzi wiele składników, które okazały się docelowymi dla bakterii zawierających motyw LPXTG (np. laminina, fibronektyna, kolagen) [51].

Obecność tych białek na powierzchni komórki odgrywa bardzo ważną rolę w przetrwaniu bakterii probiotycznych w jelitach gospodarza. Takie stwierdzenie zasugerowali Van Pijkeren i wsp. [59], którzy zbadali, że w przypadku mutantów szczepu *Lb. salivarius* UCC118, który nie wytwarzał sortazy, a jego białka zależne od sortazy nie zawierały motywu LPXTG, wykazywał znacznie mniejsze zdolności adhezyjne do komórek nabłonka jelitowego Caco-2 oraz HT29. Lebeer i wsp. [30] zauważyli, iż wiele czynników wpływa na adhezję bakterii do komórek Caco-2. Stwierdzili, że geny kodujące *FbpA*, *Mub* i *SlpA* także uczestniczą w adhezji *Lb. acidophilus* NCFM. Mutacja w tych genach powodowała 65% obniżenie adherencji szczepu.

**Białka warstwy S (S-layer proteins, SLPs)** są uznane za najbardziej zewnętrzną strukturę ściany komór-

Tabela I

Mechanizmy odpowiedzialne za zdolności adhezyjne niektórych gatunków bakterii *Lactobacillus* (w oparciu o [50])

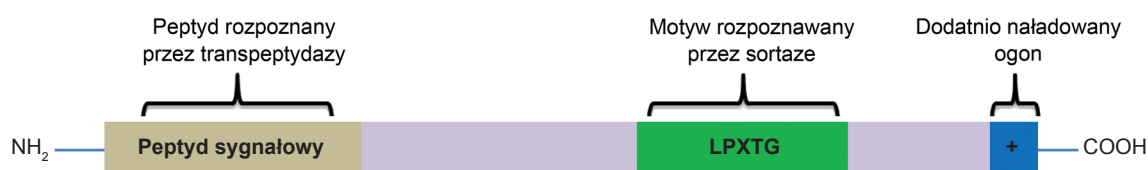
Gatunek	Efekty	Czynniki w ścianie komórkowej	Komórki docelowe w organizmie gospodarza
<i>Lb. acidophilus</i>	Agregacja i adherencja, hamowanie patogenów, wzmocnienie bariery nabłonka, immunostymulacja	MUB, białka warstwy S, białka wiążące fibronektynę, LTA, EPS	Komórki nabłonka jelitowego, śluz, macierz zewnątrzkomórkowa (ECM), fibronektyna, komórki Caco-2
<i>Lb. plantarum</i>	Adherencja, wzmocnienie bariery nabłonka, immunostymulacja	MSA, białko GAPDH	Komórki nabłonka jelitowego, śluz, komórki Caco-2
<i>Lb. brevis</i>	Adherencja, ochrona przed czynnikami stresowymi, wzmocnienie bariery nabłonka	Białka warstwy S	Komórki nabłonka jelitowego
<i>Lb. rhamnosus</i>	Adherencja, hamowanie patogenów, hamowanie apoptozy komórek nabłonka jelitowego	Fimbrie, czynniki wiążące mucyny (MCF)	Glikoproteiny śluzówki, komórki nabłonka jelitowego
<i>Lb. casei</i>	Wzmocnienie bariery nabłonka, zwiększenie produkcji śluzu, immunostymulacja	EPS, białka zależne od sortazy	Komórki Caco-2, makrofagi
<i>Lb. reuteri</i>	Adherencja, ochrona przed czynnikami stresowymi, wzmocnienie bariery nabłonka	MUB, białka wiążące kolagen (CnBP)	Komórki nabłonka jelitowego, śluz, kolagen
<i>Lb. johnsonii</i>	Adherencja	LTA, czynnik elongacji Tu, białka szoku cieplnego, pile	Komórki nabłonka jelitowego, śluz

kowej. Tworzą one jednocząsteczkową, krystaliczną warstwę o grubości 5–15 nm, zbudowaną z białek i/lub glikoprotein o masie cząsteczkowej 40–200 kDa. Białka warstwy S można znaleźć na powierzchni komórek niektórych bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz Archeonów [2]. Mogą tworzyć regularną i bardzo porowatą strukturę dwuwarstwową o różnej sieci krystalicznej: skośnej, kwadratowej lub sześciokątnej [22]. Do funkcji tych białek można zaliczyć ochronę komórki przed niskim pH, fagocytozą, enzymami i bakteriofagami [60]. Białka powierzchniowej warstwy stanowią 10–15% całej zawartości białek w komórce. Cechą charakterystyczną białek warstwy S bakterii *Lactobacillus* jest ich wysoki punkt izoelektryczny (9,35–10,40), który nadaje im silnie zasadowy charakter [6]. Niektóre szczepy *Lactobacillus* posiadają nieglikozylowane SLPs, podczas gdy inne posiadają SLPs z przyłączoną grupą cukrową [51]. Skład i właściwości warstwy powierzchniowej jest zmienny u różnych gatunków i szczepów. Jeden szczep *Lactobacillus* może posiadać wiele genów kodujących SLPs, lecz ich ekspresja nie następuje jednocześnie. Poza wieloma kopiami genów szczepy mogą także posiadać wiele promotorów tych genów. Przykładem może być *Lb. brevis* posiadający dwa promotory przed sekwencjami SLPs. Zapewnia to wysoką wydajność ekspresji tych genów, co skutkuje wzrostem adhezencji tych bakterii do komórek gospodarza [54]. Geny białek SLPs wykryto u bakterii z rodzaju *Lactobacillus*: *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. helveticus*, *Lb. crispatus* i poznano ich sekwencję. Poza tym geny te odnaleziono także u *Lb. amylovorus*, *Lb. buchneri*, *Lb. gallinarum* i *Lb. kefir*, lecz nie zostały zsekwencjonowane [44]. Istnieje wiele sposobów w jaki SLPs mogą być przytwierdzone do ściany komórkowej bakterii. Zazwyczaj podjednostki tych białek są połączone ze sobą oraz ze składnikami ściany komórkowej za pomocą wiązań niekowalencyjnych [30]. Jednym z nich są elektrostatyczne oddziaływania między C-końcami białek (białka warstwy S wiążące kolagen – CbsA u *Lb. crispatus* JCM 5810) i N-końcami białek (SlpA u *Lb. brevis* ATCC 8287) [54]. Białka warstwy S zyskały duże zainteresowanie badaczy z uwagi na fakt, że są odpowiedzialne za adhezyjne zdolności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [60]. Początkowo udział SLPs w adhezji tych bakterii do komórek Caco-2 wykazali Buck i wsp. [5]. Porównywali oni zdolności adhezyjne dzikiego szczepu *Lb. acidophilus* NCFM oraz jego mutantu posiadającego mutację w genie kodującym SLPs. Wyniki ich badań pokazały, że w przypadku mutantu zaobserwowano 84% obniżenie adhezji do komórek Caco-2 w stosunku do dzikiego szczepu. Golowczyc i wsp. [19] zaobserwowali, że po strawieniu białek SLPs u koagregującego szczepu *Lb. kefir* nastąpiło znaczne obniżenie ochrony komórek Caco-2 przed inwazją bakterii z rodzaju *Salmonella*.

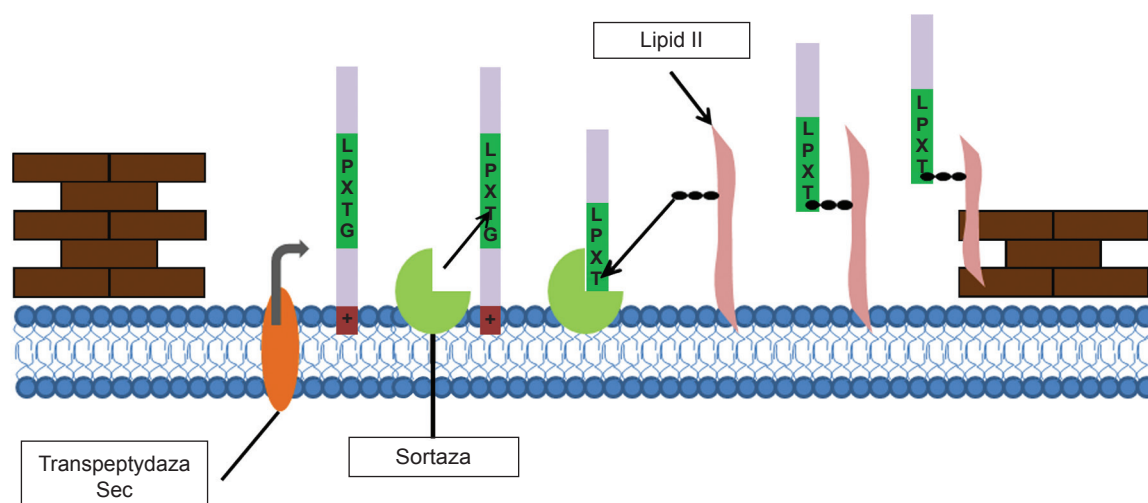
Efekt ten nie nastąpił w przypadku inkubacji bakterii *Salmonella* ze szczepem nie agregującym. Świadczy to o tym, iż białka SLPs biorą także udział w procesach agregacji komórek. Jednakże w przypadku innych badań stwierdzono, że inaktywacja SLPs u szczepu *Lb. crispatus* nie wpłynęła na zdolności adhezyjne czy agregacyjne komórek, co może świadczyć o tym, że w procesach tych uczestniczą również inne białka [51]. Dodatkowo poza specyficznymi wiązaniami tych białek mogą one zwiększać niespecyficzne wiązanie się bakterii kwasu mlekowego do powierzchni hydrofobowych na przykład w przewodzie pokarmowym lub moczowym. Efekt ten jest w dużej mierze zależny od siły jonowej środowiska [22].

**Białka zależne od sortazy (*sortase-dependent proteins*, SDPs).** Sortaza występuje bardzo często u bakterii Gram-dodatnich, także u bakterii kwasu mlekowego. Rola jaką odgrywa ten enzym w przytwierdzeniu białek do ściany komórkowej sprawia, że jest ono przedmiotem wielu badań dotyczących poszukiwania struktur uczestniczących w interakcjach między drobnoustrojami, a komórkami gospodarza [7]. Geny kodujące sortazę (*srtA*) odnaleziono np. w genomie *Lb. acidophilus* [5], *Lb. rhamnosus* GG [25], *Lb. casei* BL23 [36]. Ponadto geny kodujące sortazę pilinową z grupy C (*srtC*) odnaleziono w klasterze z ich genami docelowymi (geny *spa*) u *Lb. rhamnosus* GG oraz *Lb. casei* BL23 [36] a także u *Lb. casei* LOCK 0919 [1]. Białka zależne od sortazy mają charakterystyczną budowę. Zawierają C-końcowy motyw LPXTG, rozpoznawany przez sortazę, który umożliwia zakotwiczenie białka w ścianie komórkowej, C-końcowy region hydrofobowy i dodatkowo naładowany ogon, które także ułatwiają to wiązanie. Na N-końcu białek SDPs występuje peptyd sygnałowy umożliwiający sekrecję białka i sortazy w szlaku Sec. Zakotwiczenie C-końcowego ogona w błonie komórkowej przenosi SDP w pobliże sortazy, która znajduje się w błonie komórkowej, tak aby mogła zajść reakcja przeniesienia białka, umożliwiająca jego związanie ze ścianą komórkową [7] (rys 1).

Mechanizm wbudowywania SDPs w ścianę komórkową bakterii przedstawiono na rysunku 2. W pierwszym etapie transpeptydaza Sec rozpoznaje peptyd sygnałowy w białku SDPs i przenosi je na zewnątrz komórki. Zostaje ono umieszczone, dzięki hydrofobowemu regionowi w ogonie, w błonie komórkowej. Gdy sortaza i białko znajdują się blisko siebie, dochodzi do rozerwania wiązania między glicyną a treoniną w motywie LPXTG. W kolejnym etapie dochodzi do nukleofilowego ataku cząsteczek lipidu II, co prowadzi do rozpadu kompleksu SDP-sortaza oraz do wytworzenia intermediatu poprzez wytworzenie mostku z C-końcową treoniną (T) białka. Po tym połączeniu dochodzi do wbudowania tego intermediatu w strukturę ściany komórkowej [20].



Rys. 1. Budowa białek zależnych od sortazy (w oparciu o [6])



Rys. 2. Mechanizm kotwiczenia SDPs w ścianie komórkowej (w oparciu o [6])

**Białka wiążące śluz (*mucous binding proteins*, MUB).** Śluz wydzielany przez komórki nabłonka jelitowego stanowi pierwszą barierę obronną między drobnoustrojami a światłem jelita. Służy także jako powierzchnia do inicjacji oddziaływań gospodarz-bakterie [13]. W 2002 roku Ross i Jonsson odkryli u szczepu *Lb. reuteri* 1063 białko o masie 358 kDa, związane ze ścianą komórkową bakterii, które jest odpowiedzialne za adhezję do glikoprotein mucyn. Białka te posiadają typowy N-końcowy peptyd sygnałowy odpowiedzialny za sekrecję białka oraz motyw LPXTG umożliwiający ich zakotwiczenie w ścianie komórkowej [4]. Najlepiej zbadanym przykładem tych białek jest MUB z *Lb. reuteri*. Posiada ono dwa rodzaje powtórzeń aminokwasowych: sześć kopii MUB1 oraz osiem kopii MUB2 [23]. Białka te mogą posiadać wiele domen, jednak ich budowa strukturalna nie jest dobrze poznana [15]. Wiele szczepów *Lactobacillus* posiada kilka kopii różnych genów, co skutkuje powstawaniem białek o wysokim podobieństwie. W przypadku szczepu *Lb. acidophilus* przypuszczalnie istnieje 13 białek zawierających domeny MUB (kodowane przez gen *Lba1392*). W doświadczeniu, które polegało na inaktywacji tego genu, zaobserwowano obniżenie zdolności do adhezji badanych szczepów do enterocytów [5]. Białka te znaleziono na powierzchni szczepów *Lactobacillus* zasiedlających układ pokarmowy. Genów kodujących te białka nie znaleziono natomiast u gatunków pochodzenia roślinnego (np. *Lb. bulgaricus*, *Lb. fermentum*). Świadczy to o tym, że białka MUB biorą udział w two-

zeniu interakcji pomiędzy bakteriami a komórkami gospodarza w jelitach [39]. Istnieją także białka bardzo podobne do MUB – białko sprzyjające adhezji do śluzu (*mucous adhesion-promoting protein*, MapA). Zostało ono zidentyfikowane u *Lb. reuteri* oraz *Lb. fermentum*.

**Białka wiążące mannozę (*mannose binding proteins*).** Mannoza występująca na powierzchni komórek gospodarza może stanowić miejsce wiązania patogenów posiadających receptory wiążące mannozę. Receptory te odkryto także na powierzchni niektórych szczepów *Lb. plantarum*. Cecha ta może być wykorzystywana do ochrony przed kolonizacją patogenów adherujących do powierzchni zawierających mannozę. Białka te posiadają budowę charakterystyczną dla wielu powierzchniowych białek bakterii *Lactobacillus*. Na ich N-końcu występuje peptyd sygnałowy, natomiast na C-końcu motyw wiążący do ściany komórkowej. Białka te są podobne do białek MUB, ponieważ posiadają dwie domeny MUB [43].

**Rzęski i pile,** czyli zewnątrzkomórkowe wyrostki odgrywają znaczącą rolę w adhezji drobnoustrojów do śluzu jelitowego. Rzęski są zbudowane z tysięcy podjednostek flageliny. Wykazano, że są one zdolne do adhezji do licznych receptorów, w tym mucyn i śluzu [23]. Dodatkowo mogą działać jako ligandy i uczestniczyć w szlakach sygnałowych [55]. Pile służą do adhezji zarówno bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych [23]. Są zbudowane z białek zawierających wiele podjednostek. Zostały one wykryte u *Lb. rhamnosus* GG [51]. W genomie tego szczepu wykryto dwa skuski geny pili (*spaCBA* oraz *spaFED*), które zawie-

rały geny trzech podjednostek pilin oraz gen sortazy [25]. Innym przykładem jest operon *spaCBA* zlokalizowany na plazmidzie w szczepie *Lb. casei* ŁOCK 0919 [1]. Wiązanie się pili do śluzu w jelitach jest prawdopodobnie możliwe przez odpowiednie włókna pili zwane SpaCBA. Dodatkowo pojawia się coraz więcej informacji, że w procesie tym mogą brać także inne białka, takie jak białko MabA. Dodatkowo wykazano, że otwarta ramka odczytu u *Lb. rhamnosus* GG zawiera podstawowe elementy konstrukcyjne dla N-końcowego peptydu sygnałowego, 4 Pfam-MucBP (białka wiążącego mucyny) oraz motywu LPXTG na C-końcu rozpoznawanego przez sortazę [62].

### 3.2. Czynniki niebiałkowe

Poza białkami, na adhezję bakterii kwasu mlekowego wpływają także inne komponenty ściany komórkowej takie jak kwasy lipotejchajowe (LTA) oraz egzopolisacharydy (EPS). Wiele szczepów *Lactobacillus* wytwarza długołańcuchowe polisacharydy (EPS) składające się z rozgałęzionych cząsteczek cukrów i ich pochodnych. Mogą być one przytwierdzone do ściany komórkowej lub wydzielane do środowiska [61]. Wielu autorów sugeruje, że EPS mogą wpływać na adhezję bakterii oraz na zdolności do formowania biofilmu, w tym biofilmu w jamie ustnej [46]. Poza tym EPS chronią także komórki przed odwodnieniem w trudnych warunkach (np. obecność soli żółci), co ułatwia im przetrwanie. Sugeruje się, że egzopolisacharydy wpływają na zdolność do tworzenia agregatów, która również jest istotna w procesie kolonizacji jelit przez szczepy probiotyczne. EPS mogą także wpływać na właściwości fizyko-chemiczne powierzchni komórki, takie jak hydrofobowość oraz potencjał Zeta [12]. Lorca i wsp. [34] wykazali, że adhezja *Lb. acidophilus* CRL639 do składników ECM była związana z wytwarzaniem różnego typu egzopolisacharydów.

W ścianie komórkowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus* występują także kwasy lipotejchajowe, które mogą pośrednio wpływać na adhezję do komórek nabłonka. Związki te tworzą różne struktury, w skład których wchodzi fosforany polioli (rybitolu lub glicerolu) oraz łańcuch lipidowy umożliwiający zakotwiczenie w błonie komórkowej [6]. Obecność silnie kwasowych reszt fosforanowych sprawia, że LTA wykazują silny polielektrolityczny charakter [49]. Właściwość ta związana jest z oddziaływaniami hydrofobowymi między komórkami [42].

### 3.3. Czynniki środowiskowe

Czynniki takie jak sole żółci, niskie pH, enzymy trawienne czy stres oksydacyjny i osmotyczny wpływają na właściwości ściany komórkowej bakterii mlekowych,

a tym samym na ich zdolności adhezyjne. Prowadzą one do zmian w biosyntezie peptydoglikanu, wytwarzaniu różnych EPS oraz sekrecji LTA i WTA [51]. Wpływ enzymów trawiennych na adhezję bakterii z rodzaju *Lactobacillus* zaobserwowali Tuomola i wsp. [58], którzy wykazali, że zastosowanie enzymów trawiennych (trypsyny i pepsyny) spowodowało obniżenie adhezji *Lb. acidophilus* LA1. Świadczy to o tym, że zewnętrzna białkowa warstwa ściany komórkowej odgrywa ważną rolę w procesie adhezji komórek. Podobne wyniki uzyskali Lim i Ahn [32], którzy badali wpływ enzymów proteolitycznych na zdolności adhezyjne 7 szczepów *Lactobacillus*. Wykazali, że szczepy *Lb. plantarum* GK81, *Lb. acidophilus* GK20, *Lb. paracasei* GK74, po inkubacji z pepsyną, proteazą oraz trypsyną, wykazywały znacznie mniejszą adhezję do komórek Caco-2.

Sole żółci to związki powierzchniowo-czynne wydzielane do jelit w stężeniach 0,1–2,0% [30]. Wykazują silne działanie przeciwbakteryjne, które polega na zmianie konformacji białek i lipidów błony komórkowej, co skutkuje zmianą jej integralności i przepuszczalności. Dodatkowo sole żółci indukują wytwarzanie wolnych rodników, które powodują uszkodzenia DNA [31]. Jednakże, wiele szczepów *Lactobacillus* posiada dobrze rozwinięte mechanizmy oporności na żółć [30]. Ponadto szczepy probiotyczne mogą być ochraniane przed negatywnym wpływem soków trawiennych przez składniki żywności. Dla bakterii z rodzaju *Lactobacillus* taką rolę odgrywa mleko [16]. Jednak obecne w mleku jony wapnia mogą obniżać ich adhezję [32].

Na adhezję drobnoustrojów może mieć także wpływ sposób hodowli, a dokładniej skład pożywki, liczba bakterii i czas inkubacji [40]. Lebeer i wsp. [30] zaobserwowali, że ograniczenie dostępności glukozy w pożywce wpłynęło na formowanie biofilmu przez *Lb. rhamnosus* GG. Jednak efekt ten nie został osiągnięty w przypadku innych szczepów *Lactobacillus*. Ponadto na oddziaływanie między białkami i lipidami na powierzchni komórki wpływają także enzymy i jony wapnia [32]. Zaobserwowano także, że adhezja szczepów probiotycznych jest związana z fazą wzrostu drobnoustrojów. Sugeruje się, że komórki w fazie logarytmicznego wzrostu lepiej adherują niż komórki z fazy stacjonarnej. Jednak mechanizm utraty zdolności adhezyjnych nie jest poznany [40].

### 3.4. Tworzenie agregatów oraz oddziaływania hydrofobowe

Właściwości ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus* odgrywają ważną rolę w tworzeniu interakcji między tymi bakteriami, a komórkami nabłonka jelitowego czy mikrobiotą jelitową [26]. W przewodzie pokarmowym drobnoustroje mogą przylegać do ścian jelit poprzez wytworzenie wiązań specyficznych

lub niespecyficznych. Wiązania niespecyficzne mają charakter odwracalny i są tworzone poprzez oddziaływanie przestrzenne, elektrostatyczne i hydrofobowe [60]. W pierwszym kontakcie pomiędzy bakteriami, a komórkami nabłonkowymi lub śluzowymi kluczowe znaczenie odgrywa hydrofobowość. Konformacja powierzchniowych polimerów ma duży wpływ na ogólne właściwości fizyko-chemiczne bakterii [42]. Mikroorganizmy, które wykazują wysokie powinowactwo w stosunku do węglowodanów są uważane za hydrofobowe, natomiast szczepy słabo adherujące za hydrofilowe [14]. Jednakże zależność między organizacją strukturalną składników na powierzchni komórki, a oddziaływaniem mikroorganizmów z otoczeniem jest w dalszym ciągu otwartą kwestią [42]. Wysoka hydrofobowość powierzchni drobnoustrojów może ułatwiać, a nawet zwiększać adhezję i kolonizację organizmu gospodarza [32]. Inne badania pokazują, że nie ma powiązania między hydrofobowością, a zdolnością bakterii do adhezji, ponieważ niektóre szczepy *Lactobacillus* pomimo wysokiej hydrofobowości wykazują niską zdolność do adhezji i odwrotnie, tzn. szczepy o niskiej hydrofobowości silnie adherują do komórek nabłonka [36]. Różnice te mogą być spowodowane wysokim zróżnicowaniem budowy i składu powierzchni komórek. Ponadto bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wykazują zdolność do zmiany właściwości powierzchniowych na skutek zmian środowiskowych [51]. W związku z tym można wnioskować, że hydrofobowość powierzchni komórek nie jest dokładnym miernikiem zdolności poszczególnych szczepów do adhezji [60].

Aby bakterie probiotyczne mogły korzystnie wpływać na organizm gospodarza, muszą osiągnąć odpowiednią masę. Dlatego zdolność do agregacji jest pożądaną cechą wśród szczepów probiotycznych [8]. Tworzenie agregatów między komórkami tego samego szczepu to autoagregacja lub samoagregacja, natomiast między różnymi szczepami, a nawet gatunkami to koagregacja [37]. Właściwości te mają duże znaczenie w kolonizowaniu różnych środowisk, zwłaszcza jelit, jamy ustnej i układu moczowo-płciowego przez bakterie probiotyczne. Zdolność szczepów *Lactobacillus* do koagregacji umożliwia stworzenie bariery zapobiegającej kolonizacji przez patogeny [8] lub poprzez tworzenie koagregatów z nimi co ułatwia ich wydalenie [18]. Autoagregacja szczepów probiotycznych jest niezbędna w procesie adhezji drobnoustrojów do nabłonka jelit [35]. Do innych zalet wynikających z agregacji bakterii probiotycznych można zaliczyć możliwość wymiany genetycznej oraz immunostymulację śluzówki jelit [48].

Fizykochemiczne cechy powierzchni komórek bakterieryjnych, takie jak hydrofobowość, mogą mieć wpływ na procesy autoagregacji [28]. Wyniki badań wskazują, że powierzchnie samoagregujących szczepów bakterii kwasu mlekowego wykazują silną hydrofobowość.

Natomiast szczepy nieagregujące posiadają hydrofilowy charakter powierzchni komórek. Wiele badań wykazuje, że obecność (gliko-) białkowego materiału na powierzchni komórek wpływa na wzrost hydrofobowości, natomiast obecność polisacharydów wpływa na hydrofilowość powierzchni [35]. W procesie agregacji biorą udział białka wydzielane do medium oraz białka i lipoproteiny umiejscowione w błonie komórkowej. Zaobserwowano, że supernatant oddzielony po hodowli autoagregujących szczepów *Lactobacillus* wpływał na tworzenie agregatów także przez inne szczepy bakterii kwasu mlekowego oraz niektóre szczepy *Escherichia coli*. W przypadku *Lb. gasseri* oraz *Lb. johnsonii* scharakteryzowano gen kodujący zewnątrzkomórkowy czynnik wzbudzający agregację (*aggregation-promoting factor, Apf*) [50]. Kos i wsp. [28] zauważyli, że komórki *Lb. acidophilus* M92 poddane trawieniu proteolitycznemu wykazują mniejszą hydrofobowość i słabszą zdolność do agregacji. Zatem można podejrzewać, że istnieją białkowe mediatory biorące udział w tych procesach.

#### 4. Podsumowanie

Bakterie probiotyczne po dotarciu do jelit, aby przeciwdziałać ruchom perystaltycznym, musiały wykształcić pewne mechanizmy. Jednym z nich jest zdolność przylegania do komórek nabłonka jelitowego. Zdolności adhezyjne szczepów probiotycznych odgrywają ważną rolę podczas kolonizacji układu pokarmowego oraz mają duży wpływ na mechanizmy działania probiotycznego. Dzięki nim dochodzi do wytworzenia pierwszych interakcji pomiędzy bakteriami a organizmem gospodarza. Proces adhezji jest zjawiskiem skomplikowanym i wieloetapowym. Badania pokazują, że wiązanie się bakterii z komórkami nabłonka jelitowego nie jest regulowane przez jedne konkretne molekuly, lecz przez szereg różnych czynników. Należą do nich elementy ściany komórkowej, różne białka, obecność śluzu jelitowego oraz warunki środowiskowe. Różnorodność ta powoduje, że wciąż nie jest poznany dokładny mechanizm tego zjawiska.

#### Piśmiennictwo

1. Aleksandrak-Piekarczyk T., Koryszewska-Bagińska A., Grynberg M., Nowak A., Cukrowska B., Kozakova H., Bardowski J.: Genomic and functional characterization of the unusual pLOCK 0919 plasmid harboring the spaCBA pili cluster in *Lactobacillus casei* LOCK 0919. *Genome Biol. Evol.* **8**, 202–217 (2015)
2. Åvall-Jääskeläinen S., Palva A.: *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 511–529 (2005)
3. Beaussart A., El-Kirat-Chatel S., Herman P., Alsteens D., Mahillon J., Hols P., Dufrene Y.F.: Single-cell force spectroscopy of probiotic bacteria. *Biophys. J.* **14**, 1886–1892 (2013)



4. Boekhorst J., Helmer Q., Kleerebezem M., Siezen R.J.: Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology*, **152**, 273–280 (2006)
5. Buck B.L., Altermann E., Svingerud T., Klaenhammer T.R.: Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Environ. Microbiol.* **12**, 8344–8351 (2005)
6. Buda B., Dylus E., Górska-Frączek S., Brzozowska E., Gamian A.: Właściwości biologiczne białek powierzchniowych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Post. Hig. Med. Dosw.* **67**, 229–237 (2013)
7. Call E.K., Klaenhammer T.R.: Relevance and application of sortase and sortase-dependent proteins in lactic acid bacteria. *Front. Microbiol.* **4**, 1–10 (2013)
8. Collado M.C., Surono I., Meriluoto J., Salminen S.: Indigenous lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *Food Microbiology and Safety*, **3**, 89–93 (2007)
9. Collado M.C., Isolauri E., Salminen S., Sanz Y.: The impact of probiotic on gut health. *Curr. Drug. Metab.* **10**, 68–78 (2009)
10. Czaczyk K., Olejnik A., Miężał P., Grajek W.: Poszukiwanie prostych modeli do badania adhezji bakterii probiotycznych. *Żywn. Nauk. Technol. Ja.* **1**, 84–96 (2005)
11. Deepika G., Karunakaran E., Hurley C. R., Biggs C.A., Charalampopoulos D.: Influence of fermentation conditions on the surface properties and adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microb. Cell Fact.* **11**, 1–12 (2012)
12. Dertli E., Mayer M.J., Narbad A.: Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *BMC Microbiology*, **15**, 1–9 (2015)
13. Derrien M., Van Passel M.W.J., Van de Bovenkamp J.H.B., Schipper R., De Vos W., Dekker J.: Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*, **1**, 254–268 (2010)
14. Duary R.K., Rajput Y.S., Batish V.K., Grover S.: Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian J. Med. Res.* **134**, 664–671 (2011)
15. Etzold S., Kober O.I., Mackenzie D.A., Tailford L.E., Gunning A.P., Walshaw J., Hemmings A.M., Juge N.: Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ. Microbiol.* **16**, 888–903 (2014)
16. Fernandes M.S., Cruz A.G., Arroyo D.M., Faria J.F., Cristiani M., Sant'Ana A.S.: On the behavior of *Listeria innocua* and *Lactobacillus acidophilus* co-inoculated in a dairy dessert and the potential impacts on food safety and product's functionality. *Food Control*, **34**, 331–335 (2013)
17. Flemming H.C., Wingender J.: The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010)
18. Goh Y.J., Klaenhammer T.R.: Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microb.* **15**, 5005–5012 (2010)
19. Golowczyc M.A., Mobili P., Garrote G.L., de Los Angeles Serradel M., Abraham A.G., De Antoni G.L.: Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *J. Dairy Res.* **76**, 111–116 (2009)
20. Hendrickx A.P.A., Budzik J.M., Oh S.Y., Schneewind O.: Architects at the bacterial surface-sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 166–176 (2011)
21. Hori K., Matsumoto S.: Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem. Eng. J.* **48**, 424–434 (2010)
22. Hynönen U., Palva A.: *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biot.* **97**, 5225–5243 (2013)
23. Juge N.: Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* **1**, 30–39 (2012)
24. Kadlec R., Jakubec M.: The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *J. Dairy Sci.* **97**, 1983–1990 (2014)
25. Kankainen M., de Vos W.M. i wsp.: Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human mucus binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **40**, 17193–17198 (2009)
26. Kleerebezem M., Hols P., Bernard E., Rolain T., Zhou M., Siezen R.J., Bron P.A.: The extracellular biology of the Lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 199–230 (2010)
27. Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstania i funkcjonowania. *Ochrona środowiska*, **4**, 3–14 (2011)
28. Kos B., Suśković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S.: Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 981–987 (2003)
29. Laparra J.M., Sanz Y.: Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**, 695–701 (2009)
30. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J.: Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **4**, 728–764 (2008)
31. Li G.: Intestinal Probiotics: Interactions with bile salts and reduction of cholesterol. *Procedia Environmental Sciences*, **12**, 1180–1186 (2012)
32. Lim S.M., Ahn D.H.: Factors affecting adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and inhibitory effect on infection of *Salmonella Typhimurium*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1731–1739 (2012)
33. Linden S.K., Sutton P., Karlsson N.G., Korolik V., McGuckin: Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* **3**, 183–197 (2008)
34. Lorca G., Torino M.I., Fond D.V., Ljungh A.A.: Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 31–37 (2002)
35. Lukić J., Strahinić I., Jovčić B., Filipić B., Topisirović L., Kojić M., Begović J.: Different roles for Lactococcal aggregation factor and mucin binding protein in adhesion to gastrointestinal mucosa. *Appl. Environ. Microb.* **22**, 7993–8000 (2012)
36. Muñoz-Provencio D., Llopis M., Antolin M., de Torres I., Guarnier F., Pérez-Martínez G., Monedero V.: Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Arch. Microbiol.* **191**, 153–161 (2009)
37. Nikolic M., Jovic B., Kojic M., Topisirovic L.: Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 925–931 (2010)
38. Nishiyama K, M. Sugiyama, T. Mukai. Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. *Microorganisms*, **4**, 34 (2016)
39. O'Flaherty S., Goh Y.J., Klaenhammer T.R.: Genomic of probiotic bacteria (w) Prebiotics and Probiotics Science and Technology, red. D. Charalampopoulos, R.A. Rastall, Springer, New York, 2009 s. 681–727
40. Ouwehand A.C., Salminen S.: *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance: a review. *Microb. Ecol. Health D.* **15**, 175–184 (2003)
41. Percival S.L., Malic S., Cruz H., Williams D.W.: Introduction to biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine*, **6**, 41–68 (2011)
42. Polak-Berecka M., Waśko A., Paduch R., Skrzypek T., Sroka-Bartnicka A.: The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **106**, 751–762 (2014)

43. Pretzer G., Snel J., Molenaar D., Wiersma A., Bron P.A., Lambert J., de Vos W.M., van der Meer R., Smits M.A., Kleerebezem M.: Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **17**, 6128–6136 (2005)
44. Ramiah K., van Reenen C.A., Dicks L.M.T.: Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res. Microbiol.* **159**, 470–475 (2008)
45. Roos S., Jonsson H.: A high-molecular mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*, **148**, 433–442 (2002)
46. Ruas-Madiego P., Gueimonde M., Margolles A., Reyes-Gavilán C.G., Salminen S.: Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Protect.* **8**, 2011–2015 (2006)
47. Sánchez B., Bressollier P., Urdaci M.C.: Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol. Med. Mic.* **54**, 1–17 (2008)
48. Saran S., Bisht M.S., Singh K., Teotia U.V.S.: Comparing adhesion attributes of two isolates of *Lactobacillus acidophilus* of assessment of prebiotics, honey and inulin. *Int. J. Scientific and Research Publications*, **2**, 1–7 (2012)
49. Schaär-Zamaretti P., Ubbink J.: The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophys. J.* **85**, 4076–4092 (2003)
50. Schachtsiek M., Hammes W.P., Hertel Ch.: Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T Surface Protein Cpf Mediating Coaggregation with and Aggregation among Pathogens. *App. Environ. Microbiol.* **12**, 7078–7085 (2004)
51. Sengupta R., Altermann E., Anderson R.C., McNabb W.C., Moughan P.J., Roy N.C.: The role of cell surface architecture of *Lactobacilli* in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediat. Inflamm.* DOI: 10.1155/2013/237921 (2013)
52. Siegel S.D., Liu J., Ton-That H.: Biogenesis of the Gram-positive bacterial cell envelope, *Curr. Opin. Microbiol.* **34**, 31–37 (2016)
53. Sullan R.M.A., Beaussart A., Tripathi P., Derclaye S., El-Kirat-Chatel S., Li J.K., Schneider Y., Vanderleyden J., Lebeer S., Dufrene Y.F.: Single-cell force spectroscopy of pili-mediated adhesion, *Nanoscale*, **6**, 1134–1143 (2014)
54. Sun Z., Kong J., Hu S., Kong W., Lu W., Liu W.: Characterization of a S-layer protein from *Lactobacillus crispatus* K313 and the domains responsible for binding to cell wall and adherence to collagen. *App. Microbiol. Biotechn.* **97**, 1941–1952 (2013)
55. Tallant T., Deb A., Kar N., Lupica J., De Veer M.J., Di Donato J.A.: Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF- $\kappa$ B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* **4**, 33, (2004)
56. Thi T.T., Prigent-Combaret C., Dorel C., Lejeune P.: First stages of biofilm formation: Characterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process. *Methods Enzymol.* **336**, 152–159 (2001)
57. Tuo Y., Yu H., Ai L., Wu Z., Guo B., Chen W.: Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *J. Dairy Sci.* **96**, 4252–4257 (2013)
58. Tuomola E.M., Salminen S.J.: Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **41**, 45–51 (1998)
59. Van Pijkeren J.P., O'Toole P.W. i wsp.: Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4143–4153 (1998)
60. Van Tassel M.L., Miller M.J.: *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, **3**, 613–636 (2011)
61. Vélez M.P., De Keersmaecker S.C.J., Vanderleyden J.: Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**, 140–148 (2007)
62. Von Ossowski I., Satokari R., Reunanen J., Lebeer S., De Keersmaecker S.C.J., Vanderleyden J., de Vos W.M., Palva A.: Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4465–4472 (2011)

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

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w październiku 2016 r.  
Zaakceptowano w styczniu 2017 r.

1. Historia. 2. Taksonomia i występowanie. 3. Struktura i namnażanie się koronawirusów. 4. Receptory komórkowe wykorzystywane przez koronawirusy człowieka. 5. Zakażenie człowieka – transmisja, objawy, charakterystyka. 6. Diagnostyka. 7. Podsumowanie

#### Non-pandemic human coronaviruses – characteristics and diagnostics

**Abstract:** In this article, the characteristics of human coronaviruses (HCoV) are presented. Currently, six human coronaviruses are known: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-SARS and HCoV-MERS. The first human coronaviruses were described in the sixties of the twentieth century, the last one, HCoV-MERS, in 2012 y. Coronaviruses can cause mild, asymptomatic infections as well as severe respiratory diseases, like pneumonia and bronchiolitis. The symptoms of HCoV infection are mainly: fever, nasopharyngitis, cough, bronchiolitis, pneumonia. Infections due to HCoV occur during the whole human life, but are most frequent in children. They can occur throughout the year, but are most common in the winter season. Treatment of HCoV infections is usually symptomatic. Diagnosis of HCoV is mainly based on molecular techniques such as quantitative PCR. Serological tests are only used for epidemiological purposes.

1. History. 2. Taxonomy and occurrence. 3. The structure and amplification of human coronaviruses. 4. Cell receptors used by human coronaviruses. 5. Human infection – transmission, symptoms, characteristics. 6. Diagnostics. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** koinfekcje wirusowe, koronawirusy człowieka

**Key words:** viral co-infections, human coronaviruses

## 1. Historia

Koronawirusy (*Coronavirus*; HCoV) wywołują zachorowania na całym świecie zarówno u ludzi, jak też u zwierząt. Koronawirusy człowieka (*Human Coronavirus*; HCoV) znane są przede wszystkim jako czynniki etiologiczne zakażeń dolnych i górnych dróg oddechowych, mogą wywołać również objawy ze strony układu pokarmowego (zapalenie żołądka i jelit) oraz nerwowego [50]. Obecnie znanych jest 6 koronawirusów zakażających człowieka: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-SARS oraz HCoV-MERS, w tym 4 ostatnie opisane w XXI wieku. Wraz z rozwojem technik laboratoryjnych zmieniały się metody wykrywania koronawirusów. Koronawirusy HCoV-229E oraz HCoV-OC43 zostały po raz pierwszy opisane w połowie lat 60 XX wieku, odpowiednio w 1966 r. i 1967 r., u osób z objawami przeziębienia. Główną metodą identyfikacji wirusów było wówczas namnażanie na liniach komórkowych oraz różnicowanie antygenowe i/lub w mikroskopie elektronowym [49]. Uważano wtedy, że jedynie te dwa koronawirusy są chorobotwórcze dla człowieka. Dopiero po 40 latach, w roku 2003, zidentyfikowano kolejnego koronawirusa wywołującego zachorowania u ludzi – SARS-CoV. Wirus ten jest czynnikiem etiologicznym zespołu ostrej niewydolności oddechowej (severe acute respiratory

syndrome) i w latach 2002–2003 wywołał zachorowania u ponad 8 tys. osób, głównie w Azji. W czasie tej epidemii ponad 700 przypadków zachorowań zakończyło się zgonem. W latach 2004 i 2005, dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod biologii molekularnej, zidentyfikowano kolejne koronawirusy patogenne dla człowieka, odpowiednio, HCoV-NL63 i HCoV-HKU1. Pierwszy przypadek zachorowania wywołanego przez HCoV-NL63 opisano w Holandii u dziecka z zapaleniem oskrzelików płucnych, natomiast HCoV-HKU1 wykryto w Hong Kongu, u osoby dorosłej z zapaleniem płuc. Cztery lata temu, w 2012 r., zidentyfikowano kolejnego, groźnego dla ludzi, koronawirusa – HCoV-MERS [16, 26, 40], który jest czynnikiem epidemicznych zachorowań na Bliskim Wschodzie. Są to zachorowania o różnym przebiegu, począwszy od asymptomatycznych do ARDS (acute respiratory distress syndrome). Epidemia do chwili obecnej nie została wygaszona [43, 51].

Koronawirusy SARS i MERS zaliczane są do wirusów o potencjale pandemicznym, których identyfikacja wymaga zgłoszenia zachorowania do WHO. Natomiast pozostałe 4 koronawirusy wiązane są przede wszystkim z zakażeniami dróg oddechowych o lekkim lub niezbyt ciężkim przebiegu. Niektórzy autorzy szacują, że nawet 20–30% łagodnych zakażeń górnych dróg oddechowych, szczególnie u dorosłych oraz u starszych dzieci, jest wywoływana przez te koronawirusy [13]. Natomiast

\* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel/fax + 48 22 542 13 85; e-mail: eabramczuk@pzh.gov.pl

jako czynnik etiologiczny zakażeń dróg oddechowych wymagających hospitalizacji stwierdza się je w ok. 3–15% przypadków [9, 19, 32]. Dane epidemiologiczne, analizy objawów oraz częstości występowania koronawirusów są ograniczone, ale w związku z pojawieniem się w 2012 r. nowego koronawirusa o potencjale pandemicznym liczba badań obejmujących także pozostałe HCoV stale wzrasta.

## 2. Taksonomia i występowanie

Koronawirusy należą do rzędu *Nidovirales*, rodziny *Coronaviridae*, podrodziny *Coronavirinae*. Wyróżniono 4 rodzaje: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* oraz ostatnio wyróżnione *Deltacoronavirus* [13] (Rys.1). W obrębie poszczególnych rodzajów (czasem zwanych grupami) wyodrębnionych na podstawie różnic genetycznych oraz zdolności wykorzystywania receptorów komórkowych, wyróżniono jeszcze podgrupy np. w obrębie betakoronawirusów wyróżnia się podgrupy (linie) A, B, C i D.

Koronawirusy stanowią liczną grupę wirusów zdolnych do zakażenia różnych gatunków zwierząt. Do tej

Rząd: Nidovirales  
 Rodzina: Coronaviridae  
 Podrodzina: Coronavirinae  
 Rodzaj: Alfacoronavirus  
 Gatunek: **HCoV-NL63**; **HCoV-229E**; HKU2;  
 HKU8; TGEV; FIPV, PEDV;  
 Rodzaj: Betacoronavirus  
 Linia A  
 Gatunek: **HCoV-OC43**; **HCoV-HKU1**; MHV;  
 Linia B  
 Gatunek: **HCoV-SARS**;  
 Linia C  
 Gatunek: **HCoV-MERS**; HKU4; HKU5;  
 Linia D  
 Gatunek: HKU9;  
 Rodzaj: Deltacoronavirus  
 Gatunek: HKU11, HKU12, HKU13;  
 Rodzaj: Gammacoronavirus  
 Gatunek: IBV; TuCoV

Rys. 1. Systematyka koronawirusów

Wytłuszczonym drukiem – patogeny człowieka. Objaśnienia skrótów: PEDV – *Porcine epidemic diarrhea virus*; TGEV – *Transmissible Gastroenteritis Coronavirus*; FCoV – *Feline coronavirus*; MHV – *Mouse hepatitis virus*; FIPV – *Feline Infectious Peritonitis Virus (FCoV)*; HKU1 – *HongKong coronavirus 1*; IBV – *Infectious Bronchitis Virus (kury)*; TuCoV – *turkey coronavirus*; MERS – *Middle East Respiratory Syndrom coronavirus*; SARS – *Severe Acute Respiratory Syndrom coronavirus*.

pory opisywano zachorowania wywołane przez koronawirusy u ptaków, kotów, psów, świń, myszy, koni, wielorybów, wielbłądów oraz nietoperzy [54]. Najwięcej gatunków koronawirusów wywołujących zachorowania opisano dla człowieka (6 wirusów), świni (5) oraz nietoperzy (różne gatunki). Koronawirusy należące do

gamma- i deltakoronawirusów wykrywane są głównie u ptaków [26]. Zachorowania u ludzi wywołane są przez alfa- i betakoronawirusy. Spośród alfakoronawirusów są to: *HCoV-229E* i *HCoV-NL63*. Na podstawie wykazanej homologii sekwencji poszczególnych genów pomiędzy tymi wirusami stwierdzono, że prawdopodobnie *HCoV-NL63* wywodzi się od *HCoV-229E* [26, 45]. Natomiast spośród koronawirusów należących do betakoronawirusów zachorowania u ludzi powodują: *HCoV-OC43*, *HCoV-HKU1* oraz *HCoV-SARS* i *HCoV-MERS*. Wirusy *HCoV-HKU1* i *HCoV-OC43* klasyfikowane są do linii A betakoronawirusów, a *HCoV-SARS* do linii B. Koronawirus MERS jest pierwszym opisanym patogenem człowieka należącym do linii C z rodzaju betakoronawirusów, do której zalicza się także, wykrywane u nietoperzy, HKU4 i HKU5. Linia D w rodzaju betakoronawirus nie obejmuje organizmów uznawanych za patogenne dla człowieka (np. *CoV-HKU9* występuje jedynie u nietoperzy) [50, 54].

Do niedawna sądzono, że poszczególne koronawirusy zakażają jedynie jeden gatunek gospodarza lub ewentualnie blisko spokrewnione gatunki. Nazwy poszczególnych gatunków koronawirusów wskazywałyby na ich dość wysoką swoistość gatunkową oraz wywoływanych podstawowych objawów lub atakowanych narządów – np. *PEDV* oznacza koronawirusa wywołującego biegunki u świni zaś *FIPV* – koronawirusa kotów wywołującego zapalenie otrzewnej itp. Należy zauważyć, że w warunkach eksperymentalnych, koronawirusy wywołujące zachorowania u jednych gatunków mogą namnażać się także w organizmach innych gospodarzy, np. koronawirus psa (*CCoV*) oraz koronawirus kota (*FCoV*) mogą namnażać się w organizmie świni i powodować zmiany kliniczne, takie jak w przebiegu zakażenia *TGEV* czyli koronawirusa powodującego zapalenie żołądka i jelit świni [6].

Problem transmisji koronawirusa z jednego na drugiego gospodarza jest szczególnie istotny w aspekcie pojawiania się nowych wirusów patogennych dla człowieka. Ważnym rezerwuarem koronawirusów są przede wszystkim nietoperze, które były pierwotnym rezerwuarem *HCoV-SARS* i *HCoV-MERS* wywołujących epidemie. Obecnie uważa się, że prawdopodobnie pierwszym gospodarzem wszystkich koronawirusów były nietoperze [25, 50, 54].

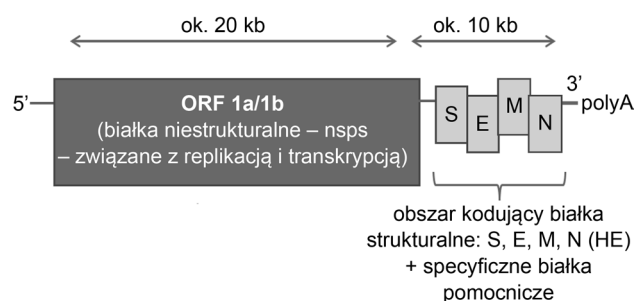
Wirus SARS jest chorobotwórczy dla ludzi i zwierząt, w tym małp, psów, kotów, szczurów. Rezerwuarem *HCoV-SARS* były początkowo nietoperze, od których ulegały zakażeniu cywety palmowe (*łuskuny palmowe*, *palm civet*), które stanowią przysmak kuchni chińskiej. W wyniku bliskiego kontaktu tych zwierząt z ludźmi, *HCoV-SARS* został przeniesiony na populację ludzką. Po opanowaniu epidemii *HCoV-SARS*, począwszy od 2005 r., wirusy te nie są izolowane od chorych z wyjątkiem zakażeń nabytych w laboratorium [26].

Wirus MERS po raz pierwszy został opisany w 2012 r. jako czynnik ciężkich i zagrażających życiu chorego zakażeń dolnych dróg oddechowych. Zakażenia te w ponad 85% obserwowane są w u osób zamieszkujących lub odwiedzających kraje Półwyspu Arabskiego (gł. Arabia Saudyjska) lub mające kontakt z osobami z tego regionu. Śmiertelność w zakażeniu *MERS-CoV* wynosi średnio 36%, ale znacznie częściej zachorowanie kończy się zgonem u osób w wieku powyżej 60 r.ż. W przypadku koronawirusa MERS pośrednim gospodarzem są wielbłądy. Badania sero-epidemiczne wykazały, że wirus podobny do MERS od lat powoduje zakażenia i zachorowania wielbłądów szczególnie na Półwyspie Arabskim i w Afryce. Obecnie, zachorowania koronawirusem MERS u ludzi są nadal obserwowane, ale ich liczba jest znacznie niższa niż na początku epidemii [51].

### 3. Struktura i namnażanie się koronawirusów

W mikroskopie elektronowym wirusy te, dzięki obecności charakterystycznych struktur białkowych w postaci powierzchniowych wypustek wystających z dwuwarstwowej osłonki lipidowej, przypominają kształtem koronę. Stąd ich nazwa – koronawirusy [26]. Ich średnica waha się od 60 do 220 nm. Nukleokapsyd koronawirusów pokryty jest dwuwarstwową osłonką, w skład której oprócz lipidów wchodzi również białka: osłonkowe (E), membranowe zwane również matriksem (M), które jest transbłonową glikoproteiną oraz glikoproteinowe wypustki. Genom koronawirusów (+ssRNA), o wielkości ok. 25–32 kb, wraz z białkiem nukleoproteiny (N) tworzy rybonukleoproteinę zwinętą w ciasny heliks. Koronawirusy posiadają jeden z największych genomów spośród wirusów RNA, co w połączeniu z wysoką zmiennością charakterystyczną dla wirusów RNA prowadzi do kumulacji zmian sekwencji genomu, czego efektem może być powstawanie różnych wariantów wirusów oraz zmiana tropizmu komórkowego [49].

Wszystkie koronawirusy charakteryzuje podobna organizacja genomu (Rys. 2). Na końcu 5' znajduje się czapeczka, natomiast na końcu 3' – łańcuch poliA. W genomie zawarta jest informacja genetyczna dla 15–16 białek niestrukturalnych (nsps) potrzebnych do replikacji, 4–5 białek strukturalnych oraz 1–8 białek tzw. „pomocniczych” [39, 47]. W genomie koronawirusów występuje 6 otwartych ramek odczytu (ORFs) [5]. Pierwsza z nich, począwszy od końca 5', ORF1a/b obejmuje ok. 2/3 genomu i koduje tzw. „geny replikazy” czyli 15–16 białek niestrukturalnych biorących udział w replikacji wirusów. Pozostała 1/3 genomu od końca 3' stanowi obszar kodujący tzw. białka strukturalne: (S) – glikoproteina powierzchniowa, (E) – małe białko osłonkowe, (M) – białko membranowe oraz



Rys. 2. Schemat organizacji genomu koronawirusów

ORF 1a/1b – otwarta ramka odczytu kodująca niestrukturalne białka związane z replikacją i transkrypcją; białka strukturalne: S (glikoproteina powierzchniowa), E (osłonkowe), M (białko membranowe), N (białko nukleokapsydu); HE – u niektórych betakoronawirusów występuje białko HE czyli Hemaglutynina-Esteraza [47].

białko nukleokapsydu – (N). W przypadku niektórych koronawirusów (np. *HCoV-SARS*) pomiędzy ORF1b a genem kodującym glikoproteinę powierzchniową znajduje się fragment kodujący białko HE (hemaglutynina-esteraza) [39].

Za wiązanie cząstek wirusa do poszczególnych receptorów na błonie komórek gospodarza, fuzję z błoną pęcherzyków endocytarnych, jak też wniknięcie wirusa do komórek gospodarza odpowiada białko S i ew. HE [33]. Badania nad poznaniem mechanizmów wnikania różnych koronawirusów do komórek trwają, ale uznaje się, że podstawowym jest endocytoza. Po fuzji osłonki wirusa z błoną endosomu wirus jest uwalniany do cytoplazmy. Mechanizm tego procesu może być różny, w zależności od gatunku wirusa. Wykazano, że w przypadku *HCoV-SARS* i *HCoV-229E* fuzja jest zależna od niskiego pH, natomiast nie zaobserwowano takiej zależności dla *HCoV-NL63* [40]. W procesie fuzji prawdopodobnie bierze udział białko S i N. Białko N jest nukleoproteiną, ściśle związaną z procesem uwalniania wirusowego RNA i tworzeniem nukleokapsydu.

Genom koronawirusów w związku z tym, że jest to pojedyncza nić RNA o dodatniej polarności i posiadająca czapeczkę, ma właściwości zakaźne. Nić +ssRNA pełni funkcję zarówno mRNA jak i genomowego RNA, które jest przepisywane na nić komplementarną stanowiącą podstawę syntezy nowych cząstek genomowych oraz syntezy nowych mRNA. Po uwolnieniu +ssRNA do cytoplazmy następuje synteza polipeptyny replikazy na bazie ORF 1a/b oraz jej cięcie i powstają białka niestrukturalne biorące udział w replikacji. Miejsmem replikacji koronawirusów są pęcherzyki utworzone z błon retikulum endoplazmatycznego (DMVs). W powstawaniu tych pęcherzyków biorą udział niestrukturalne białka wirusowe (np. nsp3, nsp4, nsp6). W procesie replikacji koronawirusów powstaje dwuniciowe RNA (dsRNA), które musi być chronione przed komórkowymi mechanizmami obronnymi, zanim zostanie przepisane na genomowe RNA (+ssRNA) lub mRNA.

Nowosyntezowane RNA może zostać wykorzystane do replikacji lub translacji. Następnie następuje synteza białek strukturalnych (S, E, M, N, HE) z subgenomowego RNA [39, 40, 47], które dalej uczestniczą w składaniu wirusów potomnych, te zaś za pośrednictwem egzocytozy uwalniane są z komórki [52].

#### 4. Receptory komórkowe wykorzystywane przez koronawirusy człowieka

Poszczególne koronawirusy wykorzystują różne receptory komórkowe, co zostało wykorzystane przy podziale na 3 grupy – w zależności od tego, jaki receptor jest przez nie rozpoznawany. Przykładowo, *HCoV-229E* (grupa 1) – wykorzystuje aminopeptydazę N (APN, CD13), *SARS-CoV* oraz *HCoV-NL63* (grupa 2) – ludzką konwertazę angiotensyny2 (hACE2), natomiast *HCoV-MERS* (grupa 2c) – dipeptydylopeptydazę 4 (DPP4). Wykazanie zdolności do rozpoznawania poszczególnych receptorów komórkowych nie jest jednoznaczne z określeniem patogennych właściwości badanego wirusa. Stwierdzono, iż powinowactwo białka S wirusa NL63 do hACE2 jest mniejsze niż w przypadku białka S wirusa SARS, co mogłoby tłumaczyć różnice w przebiegu zachorowań w wyniku zakażeń tymi wirusami [15, 26, 39, 40, 45, 49, 53]. Różnice w powinowactwie białka S do hACE2 mogą wynikać z różnic w strukturze I oraz II rzędowej. Nie należy zapominać, że receptory hACE2 są także rozpoznawane przez inne wirusy np. grypy ptaków H5N1. Wykazano zależność między obecnością tych receptorów a przebiegiem zachorowania ze strony układu oddechowego podczas zakażenia wirusem grypy ptaków H5N1. Receptory hACE2 znajdują się na komórkach w wielu tkankach człowieka, ale najsilniej ekspresja tych receptorów występuje w płucach oraz nerkach [52]. Podobieństwo *HCoV-MERS* do szczepów *CoV-HKU4* i *CoV-HKU5*, które dotychczas były izolowane jedynie od nietoperzy (odpowiednio od *Tyonycteris pachypus* i *Pipistrellus abramus*), pozwoliło na wyciągnięcie hipotezy, że nietoperze stanowią rezerwar również tego blisko spokrewnionego wirusa [54]. Co więcej, według badań przeprowadzonych przez Yang i wsp. (2015) tylko dwie mutacje w sekwencji białka S wystarczają, żeby *CoV-HKU4*, który obecnie jest uznawany za niechorobotwórczy dla ludzi, zyskał całkowitą zdolność zakażenia człowieka.

#### 5. Zakażenia człowieka: transmisja, objawy, charakterystyka

Koronawirusy wywołujące zakażenia układu oddechowego u ludzi rozprzestrzeniają się głównie drogą kropelkową, ale również przez kontakt bezpośredni

z wydaliniami pochodzącymi od osób chorych (mocz, kał, wyciek z nosa) [13]. Stwierdzono zdolność wirusów do zachowania zakaźności na powierzchniach ceramicznych, szklanych oraz wykonanych z PVC, teflonu itp. nawet przez 4–5 dni, co sugeruje istotny udział szerzenia się zakażeń poprzez dotyk skażonych powierzchni [13].

Wśród zakażeń wywoływanych u ludzi przez koronawirusy należy wyróżnić *HCoV-SARS* oraz *HCoV-MERS*, które wywołują epidemie i przebieg choroby stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia i życia chorych oraz koronawirusy *HCoV-OC43*, *HCoV-229E*, *HCoV-NL63* i *HCoV-HKU1* powodujące na ogół grypopodobne zakażenia, których częstość szacowana jest na ok. 15–20% i hospitalizacji wymaga od 2% do 10% chorych [26]. Jednak niekiedy stanowią przyczynę aż 30% potwierdzonych grypopodobnych zakażeń wirusowych [1, 46].

Objawy wywołane zakażeniem koronawirusami nie są charakterystyczne. Podwyższona temperatura ciała (pow. 37,5°C) występuje u 50–80% chorych. U dzieci obserwuje się zapalenie błony śluzowej nosa i gardła – u 10–20%, zapalenie ucha środkowego – u 15–30%, zapalenie spojówek – u 2–15%. W przypadku zakażeń dolnych dróg oddechowych u dzieci przede wszystkim obserwowane jest zapalenie oskrzeli, zapalenie płuc oraz zaostrzenie przebiegu astmy. Natomiast u hospitalizowanych osób dorosłych często występują ciężkie postaci zapalenia płuc oraz, podobnie jak u dzieci, zaostrzenie objawów POChP. U około 20–40% hospitalizowanych pacjentów (zarówno dzieci jak i dorosłych), u których wykazano zakażenie koronawirusami, stwierdzono objawy ze strony układu pokarmowego. U około 30% tych pacjentów stwierdzono także współistniejące zakażenie innym wirusem wywołującym nieżyt żołądka i jelit np. rotawirusem lub adenowirusem. Jednak objawy wyłącznie ze strony układu pokarmowego w przebiegu zakażeniami koronawirusami nie są częste [30, 48].

Zauważono, że objawy choroby mogą się różnić w zależności od gatunku wywołującego je wirusa. W przypadku zakażeń *HCoV-229E* dominują katar, przekrwienie śluzówek (congestion), niekiedy kaszel, ból gardła oraz ogólne osłabienie, co nie wymaga leczenia szpitalnego. Szacuje się, że ok. 30% zakażeń *HCoV-229E* przebiega bezobjawowo. W zakażeniach *HCoV-OC43* objawy są podobne, choć rzadziej występuje katar, a pacjenci częściej skarżą się z powodu kaszlu i świszczącego oddechu. Szacuje się, że ok. 20% zakażeń ma przebieg bezobjawowy. Chociaż nie stwierdzono różnic w przebiegu zakażeń wymagających hospitalizacji wywołanych przez *HCoV-229E* lub *HCoV-OC43* [48], to Gaunt i wsp. zaobserwowali związek między zachorowaniami wywołanymi przez *HCoV-229E* a stosowaną u chorego immunosupresją [21]. Natomiast zakażenia *HCoV-NL63* są dosyć często stwierdzane u małych dzieci, hospitalizowanych z powodu zapale-

nia oskrzeli lub krupę wirusowego. U dorosłych wirus ten może być także przyczyną zakażeń dolnych dróg oddechowych [20, 39, 48]. *HCoV-HKU1* wiązany jest przede wszystkim z zakażeniami górnych dróg oddechowych i zaostrzeniem przebiegu astmy. Wykrywano go w próbkach kału pobranych od chorych z problemami ze strony układu pokarmowego, głównie jelit, ale często w koinfekcji z innymi wirusami wywołującymi zakażenia pokarmowe [40, 48].

Najcięższy przebieg choroby obserwowany jest w zakażeniach wywoływanych przez *HCoV-SARS*. W początkach choroby są to objawy grypopodobne, często mylone z innym zakażeniem wirusowym, ale w końcowej fazie choroby *HCoV-SARS* u ok. 20% pacjentów powoduje zespół ciężkiej niewydolności oddechowej, ang. *Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)*, który może prowadzić do śmierci chorego [49]. Śmiertelność w przypadkach SARS wynosi ok. 10%. Natomiast w przebiegu ostrego zakażenia układu oddechowego wywołanego przez *HCoV-MERS* nie stwierdza się typowego dla zakażeń wirusowych 2-fazowego przebiegu choroby, jak również objawów charakterystycznych tylko dla tego wirusa. Ponadto zakażenia wirusem *HCoV-MERS* mogą czasem przebiegać łagodnie lub bezobjawowo, co stwarza trudności w postawieniu prawidłowej diagnozy wykluczającej możliwość zakażenia innymi wirusami (np. wirusem grypy). W takich przypadkach nieocenioną pomoc niesie wywiad epidemiologiczny, ponieważ zakażenia *HCoV-MERS* wiązane są z podróżami na Bliski Wschód lub kontaktem z osobą powracającą z tamtych terenów. Należy również pamiętać, że zakażenia *HCoV-MERS* występują często u osób z obniżoną odpornością i w związku z tym śmiertelność zakażeń u tych pacjentów jest dużo wyższa i wynosi od 30–60% [51].

Nishiura i wsp. (2012) uważają, że jednym z głównych czynników ułatwiających ustalenie podejrzenia o zakażenia koronawirusami jest określenie czasu inkubacji choroby. Wystąpienie objawów choroby w czasie krótszym bądź równym 2 dniom wskazuje na prawdopodobieństwo zakażenia wirusem grypy, z kolei inkubacja od 3 do 5 dni może być związana z zakażeniem ludzkimi koronawirusami [42]. Wyjątek stanowi *HCoV-SARS* i *HCoV-MERS*, dla których okres ten może wynosić nawet do 14 dni [48].

Zakażenia koronawirusami występują bez względu na płeć, wiek czy położenie geograficzne (Tab. I). Do pierwszych zakażeń człowieka dochodzi głównie we wczesnym dzieciństwie, a reinfekcje mogą występować w ciągu całego życia. Koronawirusy powodują zachorowania we wszystkich grupach wiekowych [20, 48]. Zaobserwowano jednak, iż *HCoV-229E* oraz *HCoV-HKU1* wywołują głównie zachorowania u dorosłych, natomiast *HCoV-OC43* i *HCoV-NL63* u dzieci, szczególnie poniżej 2 roku życia [1, 50].

Na świecie zakażenia koronawirusami obserwowane są przez cały rok, ale największą częstość tych zakażeń notuje się w miesiącach jesienno-zimowych lub podczas pory deszczowej. Jednak w Chinach koronawirusy wykrywane są najrzadziej podczas miesięcy jesiennych, a w Hong Kongu szczyt zachorowań *HCoV-NL63* przypada na okres wiosenno-letni [30]. W wielu krajach szczyt zachorowań wywołanych przez koronawirusy pokrywa się lub jest zbliżony do szczytu zakażeń wywołanych przez RSV i wirusy grypy [1, 48]. Badania dotyczące krążenia tych wirusów są nieliczne, ale w poszczególnych okresach zaobserwowano różną aktywność nie-epidemicznych koronawirusów. Badania te obejmowały na ogół konkretne grupy pacjentów i najczęściej byli to pacjenci hospitalizowani. Z tego powodu istnieją wątpliwości czy brak identyfikacji niektórych gatunków, *HCoV-229E* lub -*HKU1*, jako czynników etiologicznych ostrego zakażenia dróg oddechowych (ARI, acute respiratory infection) oznacza brak aktywności tych wirusów w danym regionie, czy też z powodu wywoływania głównie łagodnych zachorowań nie są one diagnozowane. Jednak należy wziąć pod uwagę, że w okresie jesienno-zimowym, kiedy koronawirusy oraz inne wirusy wywołujące zakażenia układu oddechowego, takie jak RSV, grypa, *HMPV* itp. są najczęściej wykrywane, a ich różnorodność jest najwyższa, to nadal nie wszystkie są identyfikowane. Innym problemem jest występowanie koronawirusów w zakażeniach mieszanych, co potwierdzają badania wielu zespołów i wskazują, że mogą być one jednym z najczęstszych czynników wywołujących współzakażenia z innymi wirusami. Szacuje się, że ok. 45–60% zakażeń wywołanych przez te wirusy dotyczy właśnie ko-inkubacji [26, 31]. W badaniach przeprowadzonych przez Hoe i wsp. (2007) zostało wykazane, że w przypadku współzakażenia liczba cząstek *HCoV-NL-63* jest zwykle niższa niż w przebiegu zakażenia pojedynczym wirusem. Współwystępujące zakażenia wirusowe stwierdzano przede wszystkim u osób hospitalizowanych [26], natomiast niewiele wiadomo o ewentualnych współzakażeniach wirusowych nie wymagających hospitalizacji. Najczęściej wykrywano mieszane zakażenia wywołane przez koronawirusy w połączeniu z zakażeniem RSV, *HMPV*, wirusami grypy lub enterowirusami czego powodem może być współwystępowanie tych wirusów w środowisku [Tab. I] [1].

## 6. Diagnostyka

Do 2002 r. diagnostyka zakażeń dróg oddechowych obejmująca koronawirusy prowadzona była jedynie przez nieliczne ośrodki. W związku z pojawieniem się nowego, epidemicznego gatunku *HCoV-SARS* zintensyfikowano badania nad tą rodziną wirusów. Po

Tabela I  
Wybrane badania dotyczące częstości koronawirusów

Lata badań	Kraj/region	Wiek chorych (lata)	Liczba badanych	Rozpoznanie kliniczne	Ogółem zakażenie wirusowe (%)	Częstość HCoV (%)	Inne poszukiwane patogeny	Ref.
2001–02	Chiny/Hong Kong	0–18	587	ARI	36,3	4,4	RSV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[8]
2003	Australia	0–18	1247	ARI	52,9	4,3	RSV, HRV, EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, HBoV	[23]
2004	Australia	0–60	888	ARI	31,6	8,3	RSV, HRV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[34]
2004–05	Francja	0–16	1002	ARI	bd	9,8	Ujemne w badaniu rutynowym: RSV, HRV/EV, HPIV, Flu, HAdV	[48]
2004–05	Włochy	18+	510	LRTI	42,2	3,3	RSV, HRV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[37]
2003–06	Szwajcaria*	18+	299	ARI	17,4	5,6**	RSV, HRV, HMPV, HPIV, Flu, HBoV	[20]
2005–07	Chiny/Beijing	14+	5808	ARI	34,6	1,1	RSV, HRV, EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[44]
2007–08	Korea	0–5	296	ARI	50	5,5	RSV, HRV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, HBoV	[10]
2007–08	Słowenia	0–6	592	ARI	70,6	6	RSV, HPIV, Flu, HAdV	[28]
2006–09	Szkocja	0–80	7382	ARI	28,4	2,3	RSV, HPIV, Flu, HAdV	[21]
2008–09	Europa (INFLUENCE65 surv)	65+	556	ILI	57,6	10	RSV, HRV/ EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, SARS	[18]
2010–11	Madagaskar	0–5	295	ARI	74,6	12,5	RSV, HRV, HMPV, HPIV	[27]
2010–12	Brazylia	19–80	134	URTI	32,1	0,75	RSV, HRV/EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, HBoV	[14]
2011–12	Szwajcaria	0–18 0–18 18–65 18–65 65+ 65+	645 138 904 270 920 119	URTI LRTI URTI LRTI URTI LRTI	78,6 40,6 44,6 20,4 46 23,5	5 0 9 16 13 11	RSV, HRV/EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV	[3]
2011–12	Polska (armia)	18+	399	ILI	40	36	RSV, HRV/EV, HMPV, HPIV, Flu, HAdV, HBoV	[29]
2011–13	Hiszpania	0–14	204	LRTI	91,7	2,5	RSV, HRV, HMPV, HPIV, HAdV, HBoV	[7]
2013–14	Polska (badania własne)	0–16	370	ARI	51,4	25	RSV	[1]

\* 80% badanych pacjentów było w immunosupresji

\*\* wśród próbek dodatnich częstość wykrywania koronawirusów wynosiła 32%

Objaśnienia skrótów: RSV – Respiratory syncytial virus; HMPV – Human metapneumovirus, metapneumowirus człowieka; HPIV – Human parainfluenza viruses, wirus paragrypy człowieka; Flu – Influenza virus, wirus grypy; HAdV – human adenowirus, adenowirus człowieka, EV – enterovirus, enterowirus; HRV – Human rhinovirus, rinowirus człowieka, HBoV – Human bocavirus, bokawirus człowieka; Bd – brak danych, L/URTI – infekcje dolnych/ górnych dróg oddechowych, ARI – ostre zakażenie dróg oddechowych, ILI – choroba grypopodobna.

odkryciu *HCoV-NL63* oraz *HCoV-HKU1* zdecydowanie wzrosła liczba badań, ale dopiero pojawienie się w 2012 r. *HCoV-MERS* i zwiększająca się liczba przypadków śmiertelnych w wyniku zakażenia tym wirusem spowodowało uwzględnienie zakażeń koronawirusami w rutynowej diagnostyce. W badaniach diagnostycznych wykorzystywane są materiały pobrane z układu oddechowego (wymaz z gardła, wymaz z nosa, aspirat przetchnawiczy, BAL), próbki moczu i kału oraz surowicę krwi [49]. W celu zwiększenia czułości procesu

identyfikacji, np. w przypadku *HCoV-MERS*, zalecane jest pobieranie próbek z różnych odcinków układu oddechowego oraz w różnych okresach po wystąpieniu objawów choroby. W diagnostyce zakażeń koronawirusami stosowane są metody oparte na technikach biologii molekularnej, izolacji wirusa w hodowlach komórkowych oraz metody serologiczne [51].

Ze względu na trudności związane z izolacją koronawirusów w hodowlach komórkowych, techniki biologii molekularnej są metodami z wyboru. Naj-



Tabela II  
Wybrane przykłady zastosowania metod biologii molekularnej do diagnostyki zakażeń koronawirusami

Metoda	Fragment	Genotyp	Uwagi	Ref.
Nested-PCR	Brak danych	Alfa- corona	Wykrywa m.in. HCoV-229E i HCoV-NL-63	[41]
	Brak danych	Beta- corona	Wykrywa m.in. OC43, HKU1, nie wykrywa MERS-CoV ani SARS-CoV	
Real-time PCR	Gen (N)	OC43-HCoV 229E-HCoV	Startery specyficzne dla poszczególnych koronawirusów	[24]
	ORF 1a	NL63-HCoV		
Multiplex RT-PCR	Brak danych	OC43/ HKU1 NL63/229E	Test komercyjny. Konieczność różnicowania między OC43 a HKU1 oraz NL63 a 229E	[4]
One step-RT-PCR+ sekwencjonowanie	Gen N, Gen S1, ORF1a	HKU1	Startery specyficzne dla HKU1	[48]
Real-time RT- PCR	Gen E	MERS-CoV	Test przesiewowy, większa czułość, mniejsza specyficzność	[11]
	ORF 1b	MERS-CoV	Test potwierdzenia, większa specyficzność, mniejsza czułość	[12]
	ORF 1a	MERS-CoV	Test potwierdzenia, większa specyficzność, mniejsza czułość	
Sekwencjonowanie	Gen RdRp	MERS-CoV	Różnicowanie spośród betakoronawirusów, (linia C) oraz spokrewnionych koronawirusów zwierzęcych	
RT- PCR	Gen N			Wysoce specyficzny fragment MERS-HCoV.
RT-PCR	ORF ab	Koronawirusy (pan-korona)	Możliwość wykrycia także innych niż ludzkie genotypów, ale nie wykrywa ok. 30% krążących genotypów	[22]
RT-PCR	Gen polimerazy	Koronawirusy (pan-korona)	–	
	Gen N, ORF1a, ORF1b, Gen S, Sekwencjonowanie	HCoV-NL63	Startery specyficzne dla HCoV-NL63	[36]
	Gen G	HCoV-OC43 HCoV-229E	Startery specyficzne dla HCoV-OC43 i HCoV- 229E	

częściej wykorzystywana jest technika PCR z etapem odwrotnej transkrypcji zarówno w wersji klasycznej jak i PCR w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR). W badaniach wykorzystywane są różne rozwiązania dotyczące stosowania starterów swoistych dla poszczególnych gatunków koronawirusów (PCR dla jednego gatunku wirusa lub multiplex PCR), poszukiwanie starterów dla wspólnego fragmentu genomu koronawirusów (ORF1a/b, białko nukleokapsydu-N lub białko powierzchniowe-S) [45], poszukiwanie fragmentów swoistych dla alfa- i betakoronawirusów [42]. Należy pamiętać, że powszechnie stosowane startery tzw. pankorona zaprojektowane do wykrywania możliwe wszystkich koronawirusów wywołujących zakażenia u ludzi nie wykrywają *HCoV-SARS* ani *HCoV-MERS* [22]. Z tego względu często stosowana jest kompilacja różnych testów RT-PCR (Tab. II).

Uważa się, że za wywołanie reakcji immunologicznej w odpowiedzi na zakażenie odpowiadają białka S i N. Białko S odpowiada za pierwszy etap infekcji, więc jest pierwszym celem odpowiedzi humoralnej i komórkowej [49]. Z kolei białko N najsilniej aktywuje swoistą odpowiedź odpornościową. Metody serologiczne opierają się na wykryciu konkretnych antygenów, bądź przeciwciał skierowanych w kierunku tych antygenów

w surowicy pacjenta. Problemem w przypadku badań obecności przeciwciał jest występowanie reakcji krzyżowych i uzyskiwanie wyników fałszywie pozytywnych. Reakcje krzyżowe najczęściej wynikają z reagujących krzyżowo epitopów antygenowych koronawirusów. Oddziaływanie z białkiem N *HCoV-SARS* stwierdzono dla przeciwciał *HCoV-229E* oraz *HCoV-OC43* [45]. Co więcej, wykrywanie przeciwciał u małych dzieci stanowi również istotny problem. Z badań Dijkman i wsp. [15] wynika, że u dzieci zaraz po urodzeniu stwierdza się bardzo wysoki poziom przeciwciał nabytych od matki przeciw białku N *HCoV-NL63*. Wykazano, że ich poziom zmniejsza się dopiero w 4–5 miesiącu życia. U dorosłych natomiast spadek miana przeciwciał, przede wszystkim skierowanych przeciw białkom powierzchniowym, następuje po upływie roku od zakażenia *HCoV*, co tłumaczy kilkukrotne reinfekcje [16]. Obecnie badania serologiczne w diagnostyce zakażeń koronawirusami są bardzo rzadko stosowane.

Koronawirusy można izolować w różnych liniach komórkowych, ale każdy z koronawirusów wykazuje powinowactwo do namnażania się w określonych komórkach. *HCoV-229E* po raz pierwszy wyizolowano w roku 1966 w hodowli wyprowadzonej z ludzkich embrionalnych komórek nerki (np. MRC5).

Obecnie wirus ten „przystosował się” do namnażania w wielu rodzajach linii komórkowych, powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach wirusologicznych [49]. *HCoV-OC43* został wyizolowany w 1967 r. w linii komórek tchawicy oraz w komórkach wyprowadzonych z raka ludzkiego jelita grubego (linia HRT18). *HCoV-NL63* został wyizolowany w 2004 r. w hodowli komórek małpiej nerki LLC-MK2, ale namnaża się on również w komórkach wątroby, np. w linii komórkowej Huh-7. [15, 40, 49]. Natomiast *HCoV-SARS* replikuje się w hodowlach komórek małpiej nerki (np. Vero E6, LLC-MK2) ale, należy pamiętać, że namnażenie tego wirusa może być prowadzone wyłącznie w laboratorium o podwyższonym poziomie bezpieczeństwa biologicznego (BSL3 lub 4). Do roku 2010, mimo wielu prób nie udało się namnożyć *HCoV-HKU1* w liniach komórkowych. Dopiero Pyrc i wsp. [41] z powodzeniem namnożyli wirusa *in vitro* stosując hodowlę nabłonka rzęskowego układu oddechowego (HAE). Efektem namnażania koronawirusów w hodowlach komórkowych są widoczne pod mikroskopem zmiany w postaci agregatów komórkowych, syncytii czy obrzmienie komórek [35].

## 7. Podsumowanie

Koronawirusy, jako czynniki etiologiczne głównie łagodnych, samoustępujących zakażeń układu oddechowego, nie były wcześniej wiodącym tematem badań z punktu widzenia zdrowia publicznego. Dopiero wybuch epidemii SARS-CoV, w 2003 roku, skłonił badaczy do coraz głębszego pochylenia się nad biologią tych wirusów oraz możliwościami ewentualnego leczenia zakażeń przez nie wywołanych. Wzrost zainteresowania koronawirusami doprowadził do odkrycia 4 nowych gatunków wirusów, które, jak się okazało, od dawna krążą w środowisku człowieka powodując rokrocznie ok. 20–30% zakażeń dróg oddechowych, a w 3–15% przypadków zakażeń choroby wymagają hospitalizacji. Mimo, iż zakażenia wywołane przez koronawirusy mają głównie łagodny przebieg, występują również koronawirusy (np. *HCoV-SARS*) powodujące ciężkie infekcje, niekiedy kończące się śmiercią. Koronawirusy są chorobotwórcze zarówno dla ludzi jak i zwierząt. Wraz z rozwojem badań wykazano, że koronawirusy, które uważano za patogeny zwierząt mogą wywoływać choroby u ludzi. Biorąc pod uwagę możliwość przekraczania granicy zwierzę-człowiek oraz szybką replikację wirusów, konieczne są dalsze badania nad biologią, patogenezą oraz transmisją koronawirusów. Co więcej istnieje potrzeba wyjaśnienia związku między koronawirusami a chorobami układu nerwowego (np. stwardnienie rozsiane) czy układu pokarmowego.

Dotychczas nie opracowano skutecznej metody leczenia oraz zapobiegania zachorowaniom (szczepionki przeciwko koronawirusom), ale badania są intensywnie prowadzone. Wydaje się, że najlepszą ochroną przed infekcją koronawirusów jest właściwa higiena. Koronawirusy są wrażliwe na większość powszechnie stosowanych środków dezynfekcyjnych [49].

## Piśmiennictwo

1. Abdul-Rasool S., Fielding B.C.: Understanding human coronavirus HCoV-NL63. *Open Virol. J.* **4**, 76–87 (2010)
2. Abramczuk E., Pancer K., Gut W., Lipka B., Litwińska B.: The frequency of RSV, HCoV and MERS-CoV in children with acute respiratory tract infection, Poland 2013–2014. 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Praha (2014)
3. Ambrosioni J.: Role of rhinovirus load in the upper respiratory tract and severity of symptoms in lung transplant recipients. *J. Clin. Virol.* **64**, 1–5 (2015)
4. Amini R., Jahanshahi F., Amini Y., Sekawi Z., Jalilian F.A.: Detection of human coronavirus strain HKU1 in a 2 years old girl with asthma exacerbation caused by acute pharyngitis. *Virol. J.* **9**, 142 (2012)
5. Belouzard S., Millet J.K., Licitra B.N., Whittaker G.R.: Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, **4** (2012)
6. Cavanagh D.: Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian. Pathol.* **34**, 439–448 (2005)
7. Cebeş-López M.: Viral co-infections in pediatric patients hospitalized with lower tract acute respiratory infections. *PLoS One*, **10** (2015)
8. Chiu S.S.: Human Coronavirus NL63 Infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1721–1729 (2005)
9. Choi E.H., Sung J.Y. i wsp.: The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000–2005. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 585–92 (2006)
10. Chun J.K., Kim D.S. i wsp.: Establishing a surveillance network for severe lower respiratory tract infections in Korean infants and young children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 841–844 (2009)
11. Corman V.M., Drosten C. i wsp.: Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill.* **17** (2012)
12. Corman V.M., Drosten C. i wsp.: Assay for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-MC) infections. *Euro Surveill.* **17**, 1–9 (2012)
13. Danielsson N., Catchpole M. i wsp.: Novel coronavirus associated with severe respiratory disease: Case definition and public health measure. *Euro Surveill.* **17** (2012)
14. da Silva R.C., Santos N. i wsp.: Frequency of viral etiology in symptomatic adult upper respiratory tract infections. *Braz. J. Infect. Dis.* **19**, 30–35 (2015)
15. Dijkman R., Jebbink M.F., Idrissi N.B.E., Pyrc K., Muller M.A., Kuijpers T.W., Zaaijer H.L., van der Hoek L.: Human coronavirus NL63 and 229E seroconversion in children. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2368–2373 (2008)
16. Dijkman R., Hoek L.: Human coronaviruses 229E and NL63: close yet still so far. *J. Formos. Med. Assoc.* **108**, 270–279 (2009)
17. Esper F., Ou Z., Huang Y.T.: Human coronaviruses and uncommon in patients with gastrointestinal illness. *J. Clin. Virol.* **48**, 131–133 (2010)

18. Falsey A.R., Taylor S. i wsp.: Respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in older adults with moderate to severe influenza-like illness. *J. Infect. Dis.* **209** (2014)
19. Feng L., Yang W. i wsp.: Viral etiologies of hospitalized acute lower respiratory infection patients in China, 2009–2013. *PLoS One*, **9** (2014)
20. Garbino J., Soccia P.M., Aubert J.D., Rochat T., Meylan P., Thomas Y., Tapparel C., Bridevaux P.O., Kaiser L.: Respiratory viruses in bronchoalveolar lavage: a hospital-based cohort study in adults. *Thorax*, **64**, 399–404 (2009)
21. Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C.J., Simmonds P., Templeton K.E.: Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2940–2947 (2010)
22. Gerna G., Campanini G., Rovida F., Percivalle E., Sarasini A., Marchi A., Baldanti F.: Genetic variability of human coronavirus OC43-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised Patients. *J. Med. Virol.* **78**, 938–949 (2006)
23. Greer R. M.: Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? *J. Clin. Virol.* **45**, 10–15 (2009)
24. Gunson R.N., Collins T.C., Carman W.F.: Real-time PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions. *J. Clin. Virol.* **33**, 341–344 (2005)
25. Han H.J., Wen H.L., Zhou C.M., Chen F.F., Luo L.M., Liu J.W., Yu X.J.: Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* **205**, 1–6 (2015)
26. Hoek L., Pyrc K., Berkhout B.: Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 760–773 (2006)
27. Hoffmann J., Rabezanahary H., Randriamarotia M., Ratsimbaoa A., Najjar J., Varnet G., Contamin B., Paranhos-Baccala G.: Viral and atypical bacterial etiology of acute respiratory infections in children under 5 years old living in a rural tropical area of Madagascar. *PLoS One*, **7** (2012)
28. Jevšnik M., Uršič T., Žigon N., Lusa L., Krivec U., Petrovec M.: Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect. Dis.* **12**, 365 (2012)
29. Kocik J.: Diversity of influenza-like illness etiology in Polish armed forces in influenza epidemic season. *BTICC*, **61**, 489–494 (2014)
30. Liu T.: Viral etiology of acute respiratory tract infections in hospitalized children and adults in Shandong province. *China Virol. J.* **12**, 168 (2015)
31. Liao X., Rong Z. i wsp.: New epidemiological and clinical signatures of 18 pathogens from respiratory tract infections based on a 5-year study. *PLoS One*, **10** (2015)
32. Lukšić I., Kearns P.K., Scott F., Rudan I., Campbell H., Nair H.: Viral etiology of hospitalized acute lower respiratory infections in children under 5 years of age – a systematic review and meta-analysis. *Croat. Med. J.* **54**, 122–134 (2013)
33. Lundin A., Trybala E. i wsp.: Targeting membrane-bound viral RNA synthesis reveals potent inhibition of diverse coronaviruses including the Middle East respiratory syndrome virus. *PLOS Pathogens*, **10** (2014)
34. Mackay I.M., Arden K.E., Speicher D.J., O’Neil N.T., McErlean P.K., Greer R.M., Nissen M.D., Sloots T.P.: Co-circulation of four human coronaviruses (HCoV) in Queensland children with acute respiratory tract illnesses in 2004. *Viruses*, **4**, 637–653 (2012)
35. Mesel-Lemoine M., Tangy F. i wsp.: A human coronavirus responsible for the common cold massively kills dendritic cells but not monocytes. *J. Virol.* **86**, 7577–7587 (2012)
36. Moes E., Ranst M.V. i wsp.: A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect. Dis.* **5** (2005)
37. Minosse C., Capobianchi M.R. i wsp.: Frequency of detection of respiratory viruses in the lower respiratory tract of hospitalized adults. *J. Clin. Virol.* **42**, 215–220 (2008)
38. Nishiura H., Mizumoto K., Ejima M., Zhong Y., Cowling B.J., Omori R.: Incubation period as part of the case definition of severe respiratory illness caused by a novel coronavirus. *Euro Surveill.* **17** (2012)
39. Perlman S., Netland J.: Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 439–450 (2009)
40. Pyrc K., Berkhout B., Hoek L.: The novel human coronavirus NL63 and HKU1. *J. Virol.* **81**, 3051–3057 (2007)
41. Pyrc K., Pickles R. i wsp.: Culturing the Unculturable: Human coronavirus HKU1 infects, replicates, and produces progeny virions in human ciliated airway epithelial cell cultures. *J. Virol.* **84**, 11255–11263 (2010)
42. Pyrc K., Potempa J. i wsp.: Use of sensitive, broad-spectrum molecular assay and human airway epithelium cultures for detection of respiratory pathogens. *PLoS One*, **7**, e: 32582 (2012)
43. Raj V.S., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Haagmans B.L.: MERS: emergence of a novel human coronavirus. *Curr. Opin. Virol.* **58**, 62 (2014)
44. Ren L., Wang J. i wsp.: Prevalence of human respiratory viruses in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, 2005–2007. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 1146–1153 (2009)
45. Sarah L.W., Little Z.R., Keevil C.W.: Human coronavirus 229E remains infectious on common touch surface materials. *mBio*. **6**, 1697–1715 (2015)
46. Sloots T.P., Whitley D.M., Lambert S.B., Nissen M.D.: Emerging respiratory agents: New viruses for old diseases? *J. Virol.* **42**, 233–243 (2008)
47. Ujike M., Taguchi F.: Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*, **7**, 1700–1725 (2015)
48. Vabret A., Dina J., Gouarin S., Petitjean J., Corbet S., Freymuth F.: Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin. Inf. Dis.* **42**, 634–639 (2006)
49. Vabret A., Dina J., Brison E., Brouard J., Freymuth F.: Human coronaviruses (HCoV). *Pathol. Bio.* **57**, 149–160 (2009)
50. Vijaykrishna D., Smith G.J.D., Zhang J.X., Peiris J.S.M., Chen H., Guan Y.: Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *J. Virol.* **81**, 4012–4020 (2007)
51. World Health Organization: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) summary of current situation. Literature update and risk assessment 7 July 2015, [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/179184/2/WHO\\_MERS\\_RA\\_15.1\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/179184/2/WHO_MERS_RA_15.1_eng.pdf) (16.09.2016)
52. Xiao F., Burns K.D. i wsp.: Increased urinary angiotensin-converting enzyme 2 in renal transplant patients with diabetes. *PLoS One*, **7** (2012)
53. Yang Y., Liu C., Du L., Jiang S., Shi Z., Baric R.S., Li F.: Two mutations were critical for Bat0to-Human transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **89**, 87–90 (2015)
54. Zaki A.M., Fouchier R.A.M. i wsp.: Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814–1820 (2012)
55. Zhu X., Liu Q., Du L., Lu L., Jiang S.: Receptor-binding domain as a target for developing SARS vaccines. *J. Thorac. Dis.* **5** (2013)

Piotr Zaleski\*<sup>1</sup>, Paweł Wawrzyniak<sup>1</sup>, Agnieszka Sobolewska<sup>1</sup>,  
Grażyna Płucienniczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Warszawa

Wpłynęło w listopadzie 2016 r.  
Zaakceptowano w lutym 2017 r.

1. Wstęp. 2. Naturalna modyfikacja DNA jako przeszkoda w stosowaniu plazmidów w terapii genowej. 3. Bezpieczeństwo użycia plazmidowego DNA. 4. Wprowadzenie pDNA do komórek eukariotycznych. 5. Los plazmidowego DNA po wprowadzeniu do komórek eukariotycznych. 6. Terapie genowe bazujące na pDNA. 7. Inne kierunki rozwoju terapii genowych opartych na plazmidowym DNA. 7.1 Baktiofekcja. 7.2. Alternatywna terapia genowa (Alternative Gene Therapy – AGT). 7.3. Hydrożele. 7.4. Minikoliste DNA. 7.5. Minicircle DNA. 8. Podsumowanie

### Plasmids – vectors for gene therapy

**Abstract:** The first confirmed transfer of genetic material in human was performed in 1990. Ever since, gene therapy was considered to be one of the best promising treatments of genetic diseases. The *sine qua non* of successful gene therapy are efficient genetic vectors. Recently, the most frequently used vectors in clinical trials for genetic therapies are virus-based and plasmid-based. A range of features makes plasmids useful for gene therapy, however, they have also some characteristics which make it difficult to consider plasmids as ideal vectors. The main goal of this article is to address and describe these unfavourable factors.

1. Introduction. 2. Natural modification of DNA as an obstacle to the use of plasmids for gene therapy. 3. Plasmid DNA usage safety. 4. Plasmid DNA entry into eucaryotic cells. 5. Post-entry fate of plasmid DNA in eucaryotic cells. 6. pDNA-based gene therapies. 7. Alternative routes of development of pDNA-based gene therapies. 7.1. Bactiofection. 7.2. Alternative Gene Therapy – AGT. 7.3. Hydrogels. 7.4. DNA minicircles. 7.5. DNA ministrings. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** plazmidy, terapia genowa, wektory

**Key words:** plasmids, gene therapy, vectors

## 1. Wstęp

Jednym z celów badań dotyczących genetyki mikroorganizmów jest wykorzystanie bakteryjnych mobilnych elementów genetycznych (MEG) w biotechnologii lub medycynie. W obydwu dziedzinach najczęściej wykorzystywaną w tych celach grupą bakteryjnych MEG są plazmidy. Stanowią one teoretycznie doskonały materiał do konstruowania narzędzi terapii genowych oraz szczepionek. Występują powszechnie, a ich naturalna zdolność do stabilnego utrzymywania się w komórkach bakteryjnych znacznie ułatwia i przyspiesza ich genetyczne modyfikowanie. Stosunkowo łatwe i tanie jest uzyskiwanie dużych ilości plazmidowego DNA (pDNA) [55]. Zastosowanie wektorów bakteryjnych w biologii molekularnej i biomedycynie zostało wcześniej opisane w pracy Staworzyńskiej i wsp. w 2011 roku [81].

Pierwsze doniesienia o możliwości wykorzystania plazmidowego DNA w terapiach genowych sięgają roku 1990, kiedy to Wolff i wsp. wykazali, że domięśniowe podanie plazmidowego DNA spowodowało ekspresję kodowanego genu (trans genu) [98]. Spowolnienie rozwoju skutecznych terapii genowych zostało spowodowane

przez różne czynniki np. ostre reakcje zapalne na wektory stosowane w terapiach genowych, karcenogenezę czy ograniczony efekt terapeutyczny [83]. Obecnie istnieje szereg jednostek chorobowych, dla których prowadzi się badania kliniczne z wykorzystaniem terapii genowej opartej o plazmidowy DNA np.: nowotwory (czerniak złośliwy, rak trzustki, rak piersi), choroby serca (choroba niedokrwienności kończyn, schorzenia naczyń wieńcowych), choroby zakaźne (HIV, zapalenie wątroby typu B), dziedziczne choroby jednogenu (płasawica Huntingtona, hemofilia) [32, 55].

Wektory wykorzystywane w terapiach genowych można podzielić bazując na trzech kryteriach zaproponowanych przez Ehrhardt i wsp. w 2008 roku. Po pierwsze podział według formy podawanego DNA na: „nagi” DNA lub cząsteczki wiruso-podobne (VLP – virus like particles). Drugie kryterium podziału to zdolność do pozostawania (retencji) w jądrze komórkowym, według którego wektory można pogrupować na te bez zdolności do retencji, na wektory integrujące do chromosomów oraz na wektory pozostające jako pozachromosomowe elementy na terenie jądra. Trzeci sposób podziału to uwzględnienie sposobu utrzymywania się wektorów w komórce (zdolność do replikacji):

\* Autor korespondencyjny: Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościeńska 5, 02-516 Warszawa; tel. 22 378 62 29; e-mail: zaleskip@iba.waw.pl

- integrujące – czyli włączające się w określone miejsce w chromosomowym DNA komórek gospodarza i korzystające z komórkowych mechanizmów replikacji; głównie wektory pochodzenia wirusowego (retrowirusowego lub lentiwirusowego) [25, 85]
- episomalne – czyli pozostające jako niezależne pozachromosomowe elementy na terenie jądra komórkowego; głównie wektory pochodzenia adenowirusowego lub plazmidowego z replikonem wirusowym [25]
- wektory bez zdolności do replikacji – wektory bazujące na plazmidach bez replikonu wirusowego, których liczba kopii po podaniu stopniowo spada w miarę kolejnych podziałów komórkowych; wektory te zapewniają jedynie przejściową ekspresję kodowanego transgenu [25]

Jednak to właśnie ta ostatnia grupa wektorów jest często wykorzystywana w praktyce klinicznej, mimo że pozbawiona zdolności do replikacji w komórkach docelowych i retencji na terenie jądra komórkowego [25]. Konwencjonalny wektor terapeutyczny bazujący na pDNA składa się z dwóch głównych modułów: bakteryjnego i ekspresyjnego. Moduł bakteryjny to fragment wektora zawierający wszystkie elementy niezbędne do utrzymywania się wektora w komórce bakteryjnej. Są to origin replikacji (preferowane są origin typu theta bez białka replikacyjnego np. ColE1) oraz marker umożliwiający selekcję komórek niosących plazmid. Druga część wektora to moduł ekspresyjny. Moduł ten umożliwia ekspresję genu terapeutycznego w docelowych komórkach eukariotycznych. Podstawowymi elementami tego modułu będą sekwencja promotora oraz gen terapeutyczny (GOI – gene of interest). Moduł ten jednak może być dodatkowo uzupełniany o 5'UTR (rejon 5' nie ulegający translacji), introny, fragment poliadenylowy oraz fragment genu kodujący peptyd sygnałny. Peptyd sygnałny zapewnia właściwe kierowanie zsyntetyzowanego białka [68].

Oddzielnym zagadnieniem jest dostarczenie na teren komórki narzędzi do edycji genomu. Przykładem takiego układu może być coraz powszechniej wykorzystywany system – CRISPR/Cas9 [70], którego podstawowa zaleta to możliwość wprowadzania celowanych zmian w genomie. Sam system CRISPR/Cas9 i dynamiczny rozwój jego wykorzystania to temat na oddzielną pracę. W kontekście tego opracowania należy jednak wspomnieć, że komponenty układu CRISPR/Cas9 wymagają wektorów do dostarczenia ich do komórek docelowych. Do tego celu można wykorzystywać modyfikowane wektory pochodzenia wirusowego lub jeden z szeregu nie-wirusowych systemów dostarczania leków (non-viral drug delivery systems).

Niniejsza praca poświęcona jest jednak problemom związanym z wykorzystaniem plazmidów jako wektorów do terapii genowych.

## 2. Naturalna modyfikacja DNA jako przeszkoda w stosowaniu plazmidów w terapii genowej

Metylacja jest najpowszechniejszym typem naturalnej modyfikacji materiału genetycznego. Została wykryta u przedstawicieli wszystkich grup organizmów od Archebakterii poprzez wirusy aż do kręgowców czy roślin kwiatowych [14]. Metylacja DNA to reakcja przeniesienia grupy metylowej z donora S-adenozyl-L-metioniny (AdoMet) na zasady DNA znajdujące się w specyficznym kontekście genetycznym [37]. Reakcja ta jest katalizowana przez specyficzną grupę enzymów – metylotransferazy DNA (metylazy DNA).

W przypadku organizmów prokariotycznych wykryto trzy reakcje metylacji dotyczące zasad DNA (metylacja: cytozyny do C5-metylocytozyny; cytozyny do N4-metylocytozyny; adeniny do N6-metyloadeniny) [1]. Natomiast w przypadku organizmów eukariotycznych, u których stwierdzono występowanie metylowanych zasad w DNA, mamy do czynienia przede wszystkim z modyfikacją cytozyny do C5-metylocytozyny [1] oraz wykrywaną u niższych eukariotów metylacją adeniny do N6-metyloadeniny [78]. Wynikająca z rozbieżności prokariotycznych i eukariotycznych systemów modyfikacji DNA różnica w metylacji określonych zasad w DNA stanowi jedną z barier w wykorzystaniu plazmidów do celów terapeutycznych u ludzi. Zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych metylacja DNA dotyczy zawsze zasad znajdujących się w charakterystycznym kontekście genetycznym (tzw. sekwencji rozpoznawanej przez daną metylazę). W przypadku wyższych kręgowców (np. ssaków) występuje tylko metylacja cytozyny do C5-metylocytozyny i to głównie w kontekście dinukleotydu cytozyna-guanina (CpG). Ponadto, rozmieszczenie metylowanych miejsc CpG jest nierównomierne w poszczególnych genomach ssaczy. Około 60–80% miejsc CpG pozostaje zmetylowanych [46], możliwe jest jednak odnalezienie regionów bogatych w miejsca CpG pozbawione metylacji. Są to wyspy CpG (CGIs) [21]. Obecność takich miejsc ma znaczenie w regulacji ekspresji genów, szczególnie w kontekście długookresowej represji transkrypcji (wyciszenie ekspresji) [41]. W organizmach prokariotycznych metylacja DNA związana jest przede wszystkim z systemami restrykcji-modyfikacji, a metylacja DNA odpowiedzialna za regulację ekspresji genów opiera się głównie na metylacji adeniny do N6-metyloadeniny (metylazy typu Dam i CCRm) [15]. Dużo słabiej poznana jest rola metylacji cytozyny (C5-metylocytozyny) w fizjologii bakterii [78]. Materiał genetyczny pochodzenia bakteryjnego stanowi sygnał alarmowy dla układu immunologicznego organizmów wyższych. Receptory komórek układu immunologicznego rozpoznają obce, związane z patogenami wzory molekularne np. lipopolisacharydy powierzchniowe

Tabela I

Liczba sześci nukleotydowych sekwencji potencjalnie immunogennych – tzw. miejsc CpG o odmiennym wzorze metylacji w komórkach bakteryjnych i w komórkach eukariotycznych (wiersze górne); liczebność miejsc CpG o znanym efekcie immunostymulującym (dolne wiersze) w plazmidach znalezionych w szczepie *K. pneumoniae* 287-w i w popularnych wektorach plazmidowych (szczegóły w tekście)

Sekwencje potencjalnie immunogenne (ISS)	pIGRK	pIGMS31	pIGMS32	pUC19	pBR322
RRCGY	0	2	43	14	27
GTCGY	2	0	21	6	11
RRCGT	0	2	17	9	15
Całkowita liczba potencjalnych sekwencji ISS	2	4	81	29	53
Immunostymulujące miejsca CpG (CpG-S)					
AACGTT (CpG-S) <sup>1</sup>	0	0	1	2	4
GACGTT (CpG-S) <sup>1</sup>	0	1	5	1	1
Całkowita liczba CpGs	0	1	6	3	5

<sup>1</sup> – sekwencje, których efekt immunostymulacyjny został oznaczony przez Krieg i wsp. [52]

lub kwasy nukleinowe (receptory TLR3, TLR7/8 i TLR9 związane z organellami wewnątrzkomórkowymi: retikulum endoplazmatycznym, endosomami i lizosomami) [77]. TLR9 to receptor rozpoznający DNA zawierający niemetylowane miejsca CpG [5]. Historia wykrycia motywów CpG, ich charakterystyka oraz określenie roli w odróżnianiu swoich komórek od komórek patogenów została wyczerpująco opisana w pracy Arthura M. Kriega z 2002 roku [51]. Podsumowując, w DNA bakteryjnym występują niemetylowane dinukleotydy cytozyna-guanina (CpG). Motywy CpG pozostają natomiast w znacznej większości zmetylowane w przypadku DNA komórek eukariotycznych. Immunostymulacyjny efekt bakteryjnego DNA na komórki eukariotyczne został wykryty w roku 1984 przez Tokunagę i wsp. [86]. Przyczyną immunostymulacji komórek odpornościowych w zetknięciu z DNA bakteryjnym jest stopień metylacji miejsc CpG oraz występowanie niemetylowanych dinukleotydów CpG położonych w charakterystycznym kontekście genetycznym. Pierwsze doniesienia dotyczące tego zjawiska sugerowały, że sekwencjami immunostymulacyjnymi (immunostimulatory sequences – ISS) są motywy złożone według poniższego schematu: puryna-puryna-CG-pyrimidyna-pyrimidyna [53]. Opierając się na tym schemacie udowodniono, że najbardziej immunostymulacyjnie działa na komórki ludzkie sekwencja 5'-GTCGTT [39].

Identyfikacja ISS pozwoliła na wykorzystanie inżynierii genetycznej w celu zredukowania liczby motywów CpG w obrębie danego plazmidu. Skutkowało to znacznym obniżeniem indukcji cytokin prozapalnych [102]. Dlatego też, konstruowano wektory pDNA, w których duże fragmenty naturalnego plazmidu zostały zamienione na syntetyczne fragmenty pozbawione motywów CpG [101]. Drugim kierunkiem jest poszukiwanie naturalnych plazmidów o niskim procencie par GC w DNA. Plazmidy takie jak np. wyizolowane ze szczepu *Klebsiella pneumoniae* 287-w pIGMS31 (32,7% GC) i pIGRK

(33,4% GC) [79] będą bowiem z natury pozbawione immunogennych miejsc CpG. W porównaniu do popularnie stosowanych wektorów plazmidowych czy nawet innych plazmidów izolowanych z tego samego szczepu (pIGMS32) posiadają one znacznie mniejszą liczbę miejsc potencjalnie immunogennych (Tab. I).

Wykazano, że nawet obecność jednego miejsca CpG może być wystarczająca do wywołania odpowiedzi zapalnej. Możliwe jest osiągnięcie przedłużonej ekspresji transgenu bez wywoływania odpowiedzi zapalnej na bazie wektorów pozbawionych miejsc CpG (CpG-free vector) [44, 64]. Zostało to potwierdzone poprzez badania nad wektorami o obniżonej zawartości miejsc CpG, które były w stanie zapewniać przedłużoną ekspresję kodowanego transgenu [64, 60]. Z drugiej jednak strony istnieją doniesienia wskazujące, że całkowite usunięcie miejsc CpG może wpływać na obniżenie poziomu transkrypcji genu, którego wyrażanie jest celem terapeutycznym [6]. Ekspresja transgenu może być wyciszana poprzez obecność elementów pochodzących z bakteryjnych plazmidów [13]. Wykazano również, że istotne dla ekspresji transgenu jest nie tyle usuwanie wszystkich miejsc CpG, co optymalizowanie częstości wykorzystywanych kodonów (codon usage optimization) [50].

Istnienie związku metylacji DNA z aktywacją odporności wrodzonej stanowi znaczącą przeszkodę przy stosowaniu opartych na pDNA terapii genowych, których celem ma być podtrzymanie długotrwałego poziomu ekspresji transgenu. Z drugiej strony może być zaletą przy immunizacji opartej na pDNA [29].

### 3. Bezpieczeństwo użycia plazmidowego DNA

Wektory adenowirusowe, wektory retrowirusowe oraz plazmidy są najpowszechniej wykorzystywanymi wektorami dostarczającymi geny (gene delivery

vectors) w próbach klinicznych nowych terapii genowych [96]. Istnieje podział na zwolenników stosowania w terapiach genowych wektorów pochodzenia wirusowego (viral gene delivery systems) [27, 70] oraz badaczy twierdzących, że stosowanie takich wektorów jest ryzykowne. Ci drudzy poszukują innych sposobów wydajnego dostarczania egzogennej materiału genetycznego np. „nagiego DNA” (naked DNA) często w postaci odpowiednio przygotowanego plazmidu, jako części niewirusowych narzędzi transferu genów (non-viral gene delivery systems). Definicja ta obejmuje również inne formy terapeutycznych kwasów nukleinowych np.: krótki informujący RNA (siRNA), antysensowne oligonukleotydy czy mikroRNA (miRNA), czyli cząsteczki ingerujące w ekspresję genów na poziomie post-transkrypcyjnym lub translacyjnym [94]. Za stosowaniem plazmidowego DNA w terapii genowej przemawia szereg argumentów. Po pierwsze wektory konstruowane na bazie retrowirusów mogą powodować mutacje insercyjne w procesie integracji do genomowego DNA [38]. Drugim zagrożeniem przy stosowaniu wektorów pochodzenia wirusowego może być odtwarzanie się cząsteczek wirusowych ponownie zdolnych do replikacji [9]. Obawa przed mutacjami insercyjnymi jest nadal jedną z głównych przeszkód przy stosowaniu wektorów integrujących. Zjawisko to obserwowano w przypadku ich długiego stosowania [11, 12, 22] lub gdy mutacje insercyjne łączyły się z nabytymi mutacjami somatycznymi [43]. Wektory plazmidowe nie kodują innych antygenów niż sam produkt transgenu. To daje przewagę nad wektorami wirusowymi, przeciwko którym może być kierowana odpowiedź immunologiczna, szczególnie w przypadku konieczności kolejnych podań. Ponadto, wektory wywodzące się z powszechnych ludzkich patogenów mogą napotykać przeciwciała indukowane przez uprzednie infekcje, co będzie interferowało z samą terapią (transferem genu) [72].

Istotnym zagadnieniem jest stopień czystości podawanego pDNA. Podawanie domięśniowo u myszy niektórych preparatów pDNA powodowało martwicę mięśni oraz ich późniejszą regenerację. Z kolei inne preparaty DNA nie powodowały żadnych zmian. Zjawisko to nie miało związku z sekwencją plazmidu, jego wielkością czy kodowanymi genami. Wykazano, że wynikało to z równoczesnego podawania fragmentów bakteryjnego DNA genomowego, którym zanieczyszczony był pDNA. Dlatego też kluczowe w terapii genowej z wykorzystaniem pDNA jest dopracowanie procedur izolacji i oczyszczania [55, 99].

Jeszcze inną kwestią jest konstrukcja wektorów plazmidowych z zastosowaniem markerów selekcyjnych innych niż geny oporności na antybiotyki. Zastosowanie genów oporności na antybiotyki nie jest akceptowane w badaniach klinicznych ze względu na ryzyko

rozprzestrzeniania się genów opornościowych w środowisku na drodze horyzontalnego transferu genów [90]. Kwestie wykorzystania markerów selekcyjnych i wykorzystania antybiotyków przy projektowaniu i wykorzystywaniu DNA w terapii ludzi są opisywane i regulowane przez odpowiednie organy kontrolne: WHO (Światową Organizację Zdrowia) [95], EMA (Europejską Agencję Leków) [28] czy FDA (amerykańska Agencja Żywności i Leków) [89]. Organizacje te są zgodne, co do zakazu stosowania genów kodujących oporność na antybiotyki beta-laktamowe, zaś generalna wytyczna zaleca bardzo ostrożne i przemyślane stosowanie markerów selekcyjnych wykorzystujących oporność na antybiotyki. Stosowanie terapii opartych na transferze materiału genetycznego jest również opisane w Europejskiej Farmakopei [26]. Same wytyczne dotyczące dobrych markerów selekcyjnych używanych do konstrukcji plazmidowych wektorów do terapii genowych zostały zaproponowane przez Vandermeulen i wsp., w 2011 roku [90] i są to:

- Plazmid nie powinien zapewniać żadnej korzyści gospodarzowi, a w przypadku horyzontalnego transferu genów nie może dotyczyć komórek biorcy – ten warunek w zasadzie wyklucza wykorzystanie genów oporności na antybiotyki
- Marker selekcyjny nie powinien znacznie zwiększać wielkości całego plazmidu oraz nie powinien indukować odpowiedzi immunologicznej
- Marker nie może być toksyczny dla komórek eukariotycznych
- Stabilne utrzymywanie plazmidu nie może być związane z występowaniem szkodliwych dla komórek eukariotycznych czynników, lub bardzo czułe metody muszą być stosowane w celu potwierdzenia ich całkowitego usunięcia
- Ilość uzyskiwanego plazmidowego DNA musi być wydajna bez względu na wielkość prowadzonej hodowli bakteryjnej.

W świetle takich założeń optymalizacja wektorów zarówno do terapii genowych jak i do szczepionek DNA to również proces zastępowania markerów selekcyjnych opartych na genach kodujących oporność na antybiotyki. Szereg strategii bazujących na modyfikowaniu zarówno plazmidów jak i szczepów bakteryjnych został opracowany na przestrzeni ostatnich lat. Są to np.: systemy pCor/pFAR (bazujące na plazmidach z dziką wersją niezbędnego dla komórki genu zmutowanego w chromosomie bakterii); minikoliste DNA (koliście zamknięta kasetka ekspresyjna pozbawiona szkieletu plazmidowego); technologia pORT (plazmid niosący miejsce operatorowe wiążące represor, przy braku plazmidu represor blokuje ekspresję kluczowego genu w chromosomie zmodyfikowanego szczepu bakteryjnego); selekcje bazujące na oddziaływaniach RNA/RNA [68]. Wybór układów uzależniających

szczep bakteryjny od niesionego plazmidu, a niebazujących na antybiotykooporności został szczegółowo omówiony w pracy Wright'a i wsp. [100]. Pewne jest, że wszystkie te strategie będą preferowane w celu dalszego ograniczania rozprzestrzeniania się genów antybiotykooporności [68].

Wektory nie-wirusowe, które mają wejść do użytku komercyjnego i stosowania klinicznego muszą być dobrze scharakteryzowane pod kątem skalowania procesu ich produkcji i długoterminowego przechowywania. Zaletą plazmidowych wektorów jest łatwość i niski koszt ich produkcji na dużą skalę. Sytuacja ta może ulec zmianie wraz ze wzrostem skomplikowania tych wektorów np. dołączania elementów stabilizujących czy specyficznych względem celu ligandów kierujących [92].

Zagadnieniem nadal słabo poznanym jest kwestia pozostawiania i akumulacji biomateriałów w organizmie. Postuluje się, że taka sytuacja może indukować stany zapalne, a nawet być toksyczna [92].

#### 4. Wprowadzenie pDNA do komórek eukariotycznych

Metody wprowadzania egzogenego materiału genetycznego do tkanek, organów czy komórek w terapii genowej można podzielić na dwa główne rodzaje: wirusowe metody transferu materiału genetycznego (viral gene delivery methods) i nie-wirusowe metody transferu materiału genetycznego (non-viral gene delivery methods). Każda z metod wykorzystywanych do transferu egzogenego materiału genetycznego staje się przedmiotem rozlicznych opracowań. Poniżej przytoczono wybrane pozycje:

- metoda hydrodynamiczna [8]
- działo genowe [47]
- elektroporacja plazmidowym DNA [62]
- sonoporacja [87]
- metody chemiczne jak np. łączenie pDNA z lipidami kationowymi [88]

Metodyka wprowadzania nie-wirusowego materiału genetycznego do komórek eukariotycznych jest przedmiotem wyczerpującego opracowania z 2013 roku [94]. Z tej pracy zaczerpnięto i rozwinięto Tabelę II podsumowującą nie-wirusowe metody transferu materiału genetycznego stosowane w terapiach genowych.

Sam dobór odpowiedniej metody wprowadzania egzogenego materiału genetycznego (transfekcji) do komórek eukariotycznych jest procesem złożonym i zależnym od wielu czynników. Dodatkową komplikacją jest również wybór konformacji transfekowanego DNA. Generalnie koliście zamknięte cząsteczki DNA wykazują wyższą efektywność transfekcji, natomiast liniowe fragmenty DNA (np. plazmidy poddane działaniu endonukleaz restrykcyjnych) wykazują lepszą sta-

bilność w eksperymentach *in vivo* i *in vitro*. Dodatkowo eksperymentalnie wykazano, że transfekcja kompleksami liniowy DNA-liposom zachodzi z niższą wydajnością i wymaga dodatkowych zabiegów, na przykład neutralizacji ujemnego ładunku obecnego na powierzchni błon komórkowych [93]. Liniowe fragmenty DNA są wykorzystywane do uzyskania stabilnych linii komórkowych po transfekcji, jeśli nie powiodła się transfekcja z wykorzystaniem koliście zamkniętej cząsteczki DNA. Takie podejście może zwiększyć nawet o 3 rzędy częstość integracji chromosomowej egzogenego fragmentu DNA. Wykazano, że liniowe fragmenty DNA znacznie łatwiej integrują do chromosomu [82].

#### 5. Los plazmidowego DNA po wprowadzeniu do komórek eukariotycznych

Dla skutecznej terapii genowej niezwykle ważny jest los wprowadzonego, egzogenego materiału genetycznego w obrębie transfekowanej komórki lub w tkankach/organach będących celem terapii.

Wprowadzenie plazmidowego DNA domięśniowo u świń powodowało pojawienie się pDNA w krwiobieg, ale na stosunkowo niskim poziomie, około 10% całego podanego pDNA, przy czym najwyższe stężenie osiągnięte było 15 minut po podaniu, a następnie drastycznie spadało [36]. Wykazano również, że plazmidowy DNA znajdujący się w krwiobieg jest dosyć szybko degradowany przez nukleazy znajdujące się we krwi: 20,9% po 10 minutach od domięśniowej iniekcji, 34% po godzinie, 86,6% po jednym dniu i prawie całkowite usunięcie (97,8%) po jednym tygodniu [104].

Wykorzystanie egzogenego pDNA w terapii genowej, lub jako części szczepionki wymaga ekspresji genu sklonowanego na plazmidzie. Najkorzystniejsze jest dostarczenie i skumulowanie DNA w jądrze komórkowym. Nie jest to jednak łatwe do osiągnięcia, z powodu powolnego wnikania „nagiego DNA” czy kompleksów lipidowo-DNA (lipopleksów) do komórki. Ponadto, wprowadzany materiał genetyczny może być przechwytywany przez przedziały endolizosomalne i degradowany w lizosomach [57]. Plazmidowy DNA musi pokonać trzy główne bariery: błonę komórkową, cytoplazmę oraz błonę jądrową [29]. Na drodze pasywnej dyfuzji do jądra przenikać mogą jedynie cząsteczki o ciężarze molekularnym do 45 kDa (co przekłada się na wielkość około 300 par zasad). Cząsteczki większe (a tu zaliczyć trzeba większość wektorów plazmidowych) wnikać mogą jedynie w czasie podziału mitotycznego, kiedy to błona jądrowa przejściowo traci swą integralność. Należy jednak pamiętać, że transfekcja *in vivo* dotyczy głównie komórek wolno dzielących się lub już w pełni zróżnicowanych [92]. Ponadto, plazmidowy DNA jest wrażliwy na działanie nukleaz cytoplazmatycznych,



Tabela II  
Podsumowanie nie-wirusowych metod transferu materiału genetycznego w terapiach genowych, na podstawie [94]

Metoda wprowadzenia materiału genetycznego	Zasada aplikacji	Główne zalety metody	Ograniczenia
Metody fizyczne			
Mikroiniekcja	wykorzystanie mikropipety do bezpośredniego wprowadzenia materiału genetycznego do pojedynczej komórki	Prosta, efektywna, powtarzalna, umożliwia wprowadzenie DNA wielkocząsteczkowych	Nie ma zastosowania do transfekcji dużej liczby komórek
Iniekcja igłowa	proste nastrzyknięcie DNA bezpośrednio w obręb docelowej tkanki (mięsień, wątroba, skóra, mózg)	Prosta i bezpieczna	Niska wydajność
Iniekcja ciśnieniowa	DNA wprowadzany jest w postaci zawiesiny wstrzelwanej pod ciśnieniem	Bez-igłowa, łatwa do kontrolowania, bezpieczna	Niska wydajność, czasem zdarzają się przypadki uszkodzenia tkanek
Strzelba genowa	Opłaszczony DNA cząstki metali ciężkich zostają pod ciśnieniem wstrzelone na kilka mm w głąb tkanki	Bezpieczna i wydajna	Uszkadza tkanki
Elektroporacja	Wykorzystanie impulsu prądu elektrycznego powodującego powstanie przejściowych nanoporów w błonie komórkowej docelowych komórek	Bardzo wydajna, powtarzalna, ukierunkowany transfer genów, daje możliwość wprowadzania DNA wielkocząsteczkowego	Ograniczenia zasięgu podania uniemożliwia stosowanie na dużej powierzchni; wymaga ingerencji chirurgicznej w przypadku stosowania organów wewnętrznych; stabilność genomowego DNA może być zaburzona na skutek stosowania wysokiego napięcia
Sonoporacja	Wykorzystuje ultradźwięki do wywołania przejściowego stanu przepuszczalności błon komórkowych	Bezpieczna, nieinwazyjna, zdolna do wprowadzania DNA do organów wewnętrznych bez ingerencji chirurgicznej; możliwa do stosowania przy przekraczaniu bariery krew-mózg	Niska wydajność
Hydrodynamiczny transfer genów	Wykorzystuje wysokie ciśnienie hydrostatyczne jako siłę wprowadzającą materiał genetyczny do organów wewnętrznych	Prosta, powtarzalna, bardzo wydajna (szczególnie w przypadku stosowania do komórek wątroby)	Iniekcja wymaga dużej objętości, co ogranicza stosowanie kliniczne
Wmasowanie	Dożylne podanie DNA a następnie mechaniczne masowanie organu docelowego powodujące lekkie uszkodzenie błon umożliwiające transfer DNA	Prosta i bezpieczna	Niska wydajność; wykazane tylko w przypadku komórek wątroby
Metody chemiczne			
Lipidy kationowe	Wykorzystanie kompleksów związków chemicznych i DNA do tworzenia liposomów, które mogą być wchłonięte przez komórki	Łatwe do przygotowania, tania, wysoka wydajność <i>in vitro</i>	Toksyczna; niska wydajność <i>in vivo</i>
Polimery kationowe	Tworzenie kompleksów polimeru kationowego z DNA – (polipleksu) wchłanianego przez komórkę i uwalnianego w jej wnętrzu	Łatwe do przygotowania i modyfikowania, tania, bardzo wydajna	Toksyczna, niektóre polimery nie są biodegradowalne

co daje okres półtrwania pDNA w niektórych liniach komórkowych tylko do 1–2 godzin [57].

Stosowanie elektroporacji umożliwiło monitorowanie rozprzestrzeniania się znakowanego DNA w komórce [35, 74]. Egzogenny pDNA wprowadzony na teren komórki w zależności od wielkości może zachować

prawie niezmienną mobilność (około 3 do 4 razy mniejszą niż w wodzie), lecz dotyczy to tylko małych cząsteczek (w zakresie 500–750 Da). Mobilność w cytoplazmie gwałtownie spada wraz ze wzrostem wielkości cząsteczki, w związku z tym mobilność wolnych plazmidów w cytoplazmie praktycznie nie istnieje [20].

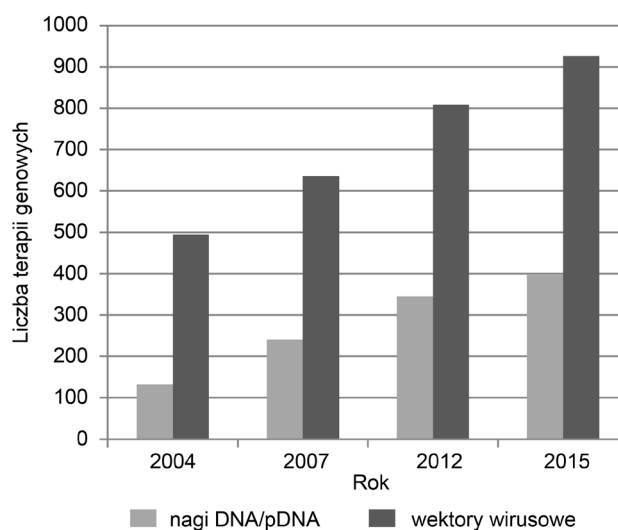
Dlatego też, aby plazmidowy DNA mógł być transportowany przez cytoplazmę musi wykorzystywać szkielet mikrotubulowy oraz białka z nim związane [91]. Niedawno wykazano oddziaływania pomiędzy pDNA wprowadzonym do komórki na drodze elektroporacji a dyneinami (białkami motorycznymi) [4]. Jednak pDNA nie wiąże się bezpośrednio z tymi białkami lecz pośrednio poprzez dodatkowe białka. Plazmidowy DNA jest w komórce aktywnie transportowany bazując na mikrotubulach – szybki transport. Natomiast powolny transport aktywny plazmidowego DNA odbywa się wzdłuż filamentów aktynowych [74].

Zagadnienie wydajnego wnikania materiału genetycznego do komórek eukariotycznych wymaga opracowania nowych metod monitorowania tego procesu np. metod bazujących na cytometrii przepływowej. Metody te są wykorzystywane przy projektowaniu i testowaniu biomateriałów (np. polimeru 447) dla nowej generacji nie-wirusowych wektorów do transferu genów (next-generation non-viral gene delivery vectors) [7].

Oddzielną kwestią jest stabilność ekspresji transgenu, co stanowi samo w sobie cel terapii. Od ponad dwudziestu lat znane są raporty pokazujące, że po wprowadzeniu „nagiego DNA” do mięśni, mózgu czy wątroby niektóre plazmidy mogą pozostawać w formie episomalnej (nie włączając się do chromosomowego DNA komórek gospodarza) dając niski poziom ekspresji nawet przez 6 miesięcy [45, 97, 103]. W związku z tym dokładne zrozumienie mechanizmów stojących za wyciszaniem ekspresji z episomalnych wektorów jest niezbędne do tworzenia skutecznych terapii opartych na wektorach nie-wirusowych. Stosowane są różne sposoby mające na celu przedłużenie czasu, w jakim transgen jest ekspresjonowany. Przykładem może być konstrukcja układu złożonego promotora/wzmacniacza (enhancera) w otoczeniu minigenu dla ludzkiego czynnika IX. W ten sposób ekspresję tego czynnika utrzymano w mysich komórkach wątroby przez 18 miesięcy. Było to pierwsze doniesienie o utrzymującej się ekspresji na poziomie terapeutycznym [63].

## 6. Terapie genowe bazujące na pDNA

Według informacji uzyskanych z bazy danych dostępnej na stronie The Journal of Gene Medicine Clinical Trial [32] prowadzonych w tej chwili jest ponad 2000 prób klinicznych dotyczących terapii genowych z czego około 18% (prawie 400) wykorzystuje wektory oparte na pDNA. Tym samym pDNA jest trzecim najczęściej wykorzystywanym w terapiach genowych typem wektora (po wektorach adenowirusowych i wektorach retrowirusowych). Dynamikę przyrostu terapii genowych wchodzących w fazę badań klinicznych prezentuje Rys. 1.



Rys. 1. Przyrost ilości terapii genowych w fazie badań klinicznych opartych na wektorach

Uwzględniono wektory wirusowe (Adeno+Retro- wirusowe) oraz wektory „nagi”/plazmidowy DNA na przestrzeni lat 2004–2015. Na podstawie prac [23–24, 32–33].

Dynamika wzrostu terapii genowych opartych na bazie „nagiego DNA” i plazmidowego DNA (pDNA) szczególnie widoczna była w latach 2004–2012 [23–24, 32–33].

W ciągu ostatniej dekady opublikowano szereg raportów dotyczących poszczególnych etapów badań klinicznych dla różnych jednostek chorobowych. Badania na modelach zwierzęcych prowadzone były przykładowo dla: choroby niedokrwiennej kończyn [49], choroby niedokrwiennej mięśnia sercowego [76], choroby Parkinsona w modelu wykorzystującym małpy naczelnne [48]. Ważniejsze jest jednak, że prowadzi się badania kliniczne nad terapiami genowymi opartymi o zastosowanie plazmidowego DNA u ludzi. Dostępne są raporty z badań klinicznych dotyczących cukrzycy z polineuropatią [73]. W 2013 roku ukazało się pierwsze opracowanie dotyczące leczenia czerniaka skóry poprzez bezpośrednie wstrzykiwanie plazmidowego DNA kodującego gen dla antyangiogenego peptydu metargidyny (AMEP) w miejsca zmian nowotworowych [80]. Plazmidowy DNA był wykorzystywany zwłaszcza w próbach leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego ze względu na możliwość wprowadzania pDNA do mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych [84]. Podawanie domięśniowe zostało wykorzystane w leczeniu bolesnych neuropatii obwodowych u chorych z cukrzycą. Podawany był pDNA (VM202) niosący gen HGF-X7 dla dwóch izoform czynnika wzrostu hepatocytów (HGF). Badania te dotyczyły fazy 1/2 badań klinicznych [2]. Ten sam plazmid VM202 również ekspresjonujący HGF został dwa lata wcześniej wykorzystany w fazie I badań klinicznych dotyczących bezpieczeństwa stosowania pDNA do leczenia pacjentów z chorobą niedokrwinną kończyn [40]. Ekspresja genu dla HGF umożliwiła rów-

niez leczenie chorób tętnic obwodowych (peripheral arterial disease – PAD). W tych próbach klinicznych wykorzystano komercyjny plazmid pVAX1 jako wektor do klonowania genu dla HGF [61].

Podjęto również szereg prób wykorzystania genu dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor – VEGF) w terapiach genowych skierowanych na leczenie schorzeń niedokrwiennych. Terapie polegały głównie na iniekcjach pDNA kodującego gen dla VEGF bezpośrednio do rejonu zawału mięśnia sercowego. Przeprowadzono ponad 20 prób klinicznych, które wykazywały poprawę ukrwienia rejonów zmienionych chorobowo, ale tylko na wczesnych etapach terapii [34]. Podobnie można podsumować wyniki przeprowadzanej w Polsce próby klinicznej wykorzystania plazmidu pVIF kodującego dwa geny: dla VEGF i dla czynnika wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor – FGF) do leczenia choroby niedokrwiennej serca. Pomimo odczuwalnej przez pacjentów poprawy, nie wykazano istotnych zmian ukrwienia mięśnia sercowego [54].

Według aktualnych doniesień z bazy danych badań klinicznych, w Polsce prowadzone są badania nad pięcioma terapiami genowymi bazującymi na plazmidowym DNA. Są to badania nad terapiami w leczeniu guzów układu pokarmowego; guzów mózgu, raka sromu oraz dwa programy dotyczące leczenia chorób kardiologicznych [32].

## 7. Inne kierunki rozwoju terapii genowych opartych na plazmidowym DNA

Oprócz wspomnianych w tej pracy metod terapii genowych opartych na pDNA podejmowane są też badania mające na celu znalezienie odmiennych sposobów podawania pDNA lub wytwarzania nowych wydajniejszych form terapeutycznego DNA. Każde z prezentowanych poniżej podejść może być przedmiotem oddzielnej pracy przeglądowej i stąd ograniczanie tematu tylko do zasygnalizowania odmiennych ścieżek badawczych.

### 7.1. Baktofekcja

Baktofekcja to wykorzystywanie żywych bakterii do bezpośredniego transferu materiału genetycznego do docelowego organizmu, organu lub tkanki [30, 69]. Taka metoda wykorzystana była do eksperymentalnej terapii w modelu nowotworowym opartej na podawaniu szczepu *Salmonella* niosącego plazmidy ekspresujące geny dla różnych cytokin [3]. Wykazano jednak, że baktofekcja jest bardziej wydajna w przypadku podawania genetycznie modyfikowanego szczepu *Escherichia coli* do błon śluzowych okrężnicy lub płuc [10, 56]

### 7.2. Alternatywna terapia genowa (Alternative Gene Therapy – AGT)

Innym sposobem wykorzystania szczepów bakteryjnych w terapiach genowych jest tzw. alternatywna terapia genowa (AGT). Polega ona na wykorzystaniu genetycznie modyfikowanych szczepów bakteryjnych do ekspresji i wydzielania terapeutycznych białek bezpośrednio w organizmie gospodarza [30]. Niezwykle istotne w tym kontekście były badania Loessnera i wsp., które wykazały możliwość regulowania ekspresji genu dla terapeutycznego białka z plazmidu *in vivo* [58].

### 7.3. Hydrożele

Hydrożele to trójwymiarowe, usieciowane układy polimerów, które mogą być wykonane z dowolnego polimeru rozpuszczalnego w wodzie. Ta dowolność daje możliwość wykorzystania ich szerokich własności fizyko-chemicznych. Ponadto hydrożele mogą być formowane w różne postacie: płytki, powłoki, filmy, mikro i nano cząsteczki. Dlatego też hydrożele znalazły szerokie zastosowanie w praktyce klinicznej i biomedycynie doświadczalnej: do tworzenia implantów biomedycznych, w inżynierii tkankowej, bionanotechnologii oraz do opracowywania nowych sposobów podawania leków. Porowata struktura umożliwia, bowiem lokowanie np. leku w matrycy żelowej, a następnie planowe jego uwalnianie ze znaną dynamiką zależną od współczynnika dyfuzji. Ponadto powolna elucja pozwala na zachowanie lokalnie wysokiego stężenia uwalnianego preparatu w otaczających tkankach nawet przez dłuższy czas [42]. Bazując na tym zjawisku, wykorzystanie hydrożeli do terapii genowych polega właśnie na kontrolowanym w czasie wydzielaniu terapeutycznego materiału genetycznego do otaczającego środowiska. Tym samym zapewnia się przedłużoną ekspresję transgenu, zmniejsza się ilość koniecznych dawek i obniża się toksyczność terapii dla innych organów (niebędących bezpośrednimi celami terapii) [16–17].

### 7.4. Minikoliste DNA

Inne proponowane podejście to wykorzystanie syntetycznych, małych, kolistych zamkniętych cząsteczek DNA czyli mcDNA (minicircle DNA vectors) uzyskiwanych na bazie pDNA. Dotychczas oczyszczanie wektorów mcDNA było procesem bardzo pracochłonnym oraz wieloetapowym, polegającym na wycinaniu i oczyszczaniu odpowiednio przygotowanych fragmentów plazmidów. Jednak wykorzystanie systemów rekombinacyjnych pochodzenia prokariotycznego (głównie fagowego) znacznie usprawniło cały proces [67]. Darquet i wsp., w dwóch pracach z lat 1997 i 1999 po raz pierwszy wykazali, że

zastosowanie mcDNA pozwalało na uzyskanie znacznie wyższego poziomu ekspresji transgenu w porównaniu z macierzystym plazmidem, lub z innym wektorem niosącym ten sam transgen [18–19]. Według badaczy mcDNA powinno zapewniać ciągłą i specyficzną względem celu (in-targeted) ekspresję transgenu [31]. Ponadto, mcDNA łatwiej jest wprowadzać do komórek eukariotycznych uznanych za trudno transformowalne np. neuronalne komórki macierzyste (neural stem cells – NCS), w porównaniu do pDNA [59]. Jako główne zalety mcDNA uznaje się fakt, że nie posiadają fragmentów pochodzenia bakteryjnego (origin replikacji, marker selekcyjny), są mniej immunogenne oraz mniejsze [66].

### 7.5. Mininici DNA

Podobny kierunek rozwoju prezentuje poszukiwanie bardziej wydajnych wektorów do transferu genów. Konstruuje się mini nici DNA (DNA ministrings), czyli małe, liniowe, kowalennie zamknięte fragmenty DNA zawierające jedynie transgen, a pozbawione zupełnie sekwencji pochodzenia bakteryjnego. Są to w zasadzie tylko kasety ekspresyjne. Postuluje się, że takie terapie mogą być bezpieczniejsze od tych wykorzystujących plazmidy i inne koliste wektory DNA [65]. W przypadku komórek wolno-dzielących się mininici DNA są lepiej pobierane (większa wydajność transfekcji) oraz wykazują wyższy poziom ekspresji genu terapeutycznego. Uważa się, że mininici DNA są bezpieczniejsze w stosowaniu ze względu na swoją niższą immunogenność oraz znacznie mniejszą tendencję do integracji do genomu gospodarza [65].

### 8. Podsumowanie

Począwszy od pionierskich eksperymentów z końca lat 80. XX wieku, które umożliwiły przeprowadzenie pierwszego oficjalnie potwierdzonego transferu materiału genetycznego u ludzi [75] terapia genowa jest uważana za jeden z najlepiej rokujących sposobów leczenia chorób o podłożu genetycznym. Koniecznym warunkiem dostarczania materiału genetycznego do miejsc objętych terapią są wydajne wektory. W tej chwili najpowszechniej wykorzystywane są wektory pochodzenia wirusowego oraz plazmidowy DNA. Szereg cech plazmidów stanowi o ich przydatności w terapii genowej, niemniej istnieje kilka przeszkód uniemożliwiających traktowanie plazmidów jako wektorów idealnych. Główne bariery zostały omówione w niniejszej pracy, a najważniejszy wniosek płynący ze studiowania zaprezentowanych źródeł to konieczność poszukiwania kolejnych sposobów na modyfikowanie plazmidowego

DNA oraz dalsze badania w kierunku znalezienia sposobu na wydajne dostarczanie terapeutycznego materiału genetycznego do docelowych komórek.

### Piśmiennictwo

- Ahmad I., Rao D.N.: Chemistry and biology of DNA methyltransferases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **5–6**, 361–380 (1996)
- Ajrout-Driss S., Christiansen M., Allen J.A., Kessler J.A.: Phase 1/2 open-label dose-escalation study of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with painful diabetic peripheral neuropathy. *Mol. Ther.* **21**, 1279–1286 (2013)
- Agorio C., Schreiber F., Sheppard M., Mastroeni P., Fernandez M., Martinez M.A., Chabalgoity J.A.: Live attenuated *Salmonella* as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J. Gene Med.* **9**, 416–423 (2007)
- Badding M.A., Lapek J.D., Friedman A.E., Dean D.A.: Proteomic and functional analyses of protein-DNA complexes during gene transfer. *Mol. Ther.* **21**, 775–785 (2013)
- Barber G.N.: Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol. Rev.* **243**, 99–108 (2011)
- Bauer A.P., Leikam D., Krinner S., Notka F., Ludwig C., Langst G., Wagner R.: The impact of intragenic CpG content on gene expression. *Nucleic Acids Res.* **38**, 3891–3908 (2010)
- Bishop C.J., Majewski R.L., Guiriba T.-R.M., Wilson D.R., Bhise N.S., Quiñones-Hinojosa A., Green J.J.: Quantification of cellular and nuclear uptake rates of polymeric gene delivery nanoparticles and DNA plasmids via flow cytometry. *Acta Biomater.* **37**, 120–130 (2016)
- Bonamassa B., Hai L., Liu D.: Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research. *Pharm. Res.* **28**, 694–701 (2011)
- Broeke A.V., Burny A.: Retroviral vector biosafety: lessons from sheep. *J. Biomed. Biotechnol.* **1**, 9–12 (2003)
- Castagliuolo I., Beggiao E., Brun P., Barzon L., Goussard S., Manganelli R., Grillot-Courvalin C., Palu G.: Engineered *E. coli* delivers therapeutic genes to the colonic mucosa. *Gene Ther.* **12**, 1070–1078 (2005)
- Chandler R.J., LaFave M.C., Varshney G.K., Burgess S.M., Venditti C.P.: Genotoxicity in mice following AAV gene delivery: a safety concern for human gene therapy? *Mol. Ther.* **24**, 198–201 (2016)
- Chandler R.J., LaFave M.C., Varshney G.K., Trivedi N.S., Carrillo-Carrasco N., Senac J.S., Wu W., Hoffmann V., Elkahloun A.G., Burgess S.M., Venditti C.P.: Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J. Clin. Invest.* **125**, 870–880 (2015)
- Chen Z.Y., He C.Y., Meuse L., Kay M.A.: Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements *in vivo*. *Gene Ther.* **11**, 856–864 (2004)
- Cheng X.: DNA modification by methyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 4–10 (1995)
- Collier J.: Epigenetic regulation of the bacterial cell cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 722–729 (2009)
- Costa D., Valente A.J.M., Miguel M.G., Queiroz J.: Plasmid DNA hydrogels for biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **205**, 257–264 (2014)
- Costa D., Valente A.J.M., Miguel M.G., Queiroz J.: Plasmid DNA microgels for drug/gene co-delivery: A promising approach for cancer therapy. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **442**, 181–190 (2014)

18. Darquet A.M., Cameron B., Wils P., Scherman D., Crouzet J.: A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther.* **4**, 1341–1349 (1997)
19. Darquet A.M., Rangara R., Kreiss P., Schwartz B., Naimi S., Delaère P., Crouzet J., Scherman D.: Minicircle: an improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther.* **6**, 209–218 (1999)
20. Dauty E., Verkman A.S.: Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *J. Biol. Chem.* **280**, 7823–7828 (2005)
21. Deaton A.M., Bird A.: CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010–1022 (2011)
22. Donsante A., Vogler C., Muzyczka N., Crawford J.M., Barker J., Flotte T., Campbell-Thompson M., Daly T., Sands M.S.: Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther.* **8**, 1343–1346 (2001)
23. Edelstein M.L., Abedi M.R., Wixon J.: Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *J. Gene Med.* **9**, 833–842 (2007)
24. Edelstein M.L., Abedi M.R., Wixon J., Edelstein R.M.: Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004 – an overview. *J. Gene Med.* **6**, 597–602 (2004)
25. Ehrhardt A., Haase R., Schepers A., Deutsch M.J., Lipps H.J., Baiker A.: Episomal vectors for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **8**, 147–161 (2008)
26. European Pharmacopea 8.0., Chapter 5.14. 705–716 (2014)
27. Escors D., Breckpot K.: Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, **58**, 107–119 (2010)
28. European Medicines Agency (EMA): Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products. Doc. Ref. EMA/273974/2005, (2005)
29. Faurez F., Dory D., Le Moigne V., Gravier R., Jestin A.: Biosafety of DNA vaccines: new generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmid after injection. *Vaccine*, **28**, 3888–3895 (2010)
30. Gardlik R., Behuliak M., Palffy R., Celec P., Li C.J.: Gene therapy for cancer: bacteria-mediated anti-angiogenesis therapy. *Gene Ther.* **18**, 425–431 (2011)
31. Gaspar V., de Melo-Diogo D., Costa E., Moreira A., Queiroz J., Pichon C., Correia I., Sousa F.: Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* **15**, 353–379 (2015)
32. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (28.10.2016)
33. Ginn S.L., Alexander I.E., Edelstein M.L., Abedi M.R., Wixon J.: Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J. Gene Med.* **15**, 65–77 (2013)
34. Giacca M., Zacchigna S.: VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. *Gene Ther.* **19**, 622–629 (2012)
35. Golzio M., Teissie J., Rols M-P.: Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1292–1297 (2002)
36. Gravier R., Dory D., Laurentie M., Bougeard S., Cariolet R., Jestin A.: *In vivo* tissue distribution and kinetics of a pseudorabies virus plasmid DNA vaccine after intramuscular injection in swine. *Vaccine*, **25**, 6930–6938 (2007)
37. Gromova E.S., Khoroshaev A.V.: Prokaryotic DNA methyltransferases: the structure and the mechanism of interaction with DNA. *Mol. Biol.* **37**, 260–272 (2003)
38. Haccin-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M. i wsp.: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, **302**, 415–419 (2003)
39. Hartmann G., Krieg A.M.: Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol.* **164**, 944–953 (2000)
40. Henry T.D., Hirsch A.T., Goldman J., Wang Y.L., Lips D.L., McMillan W.D., Duval S., Biggs T.A., Keo H.H.: Safety of a non-viral plasmid-encoding dual isoforms of hepatocyte growth factor in critical limb ischemia patients: a phase I study. *Gene Ther.* **18**, 788–794 (2011)
41. Hernando-Herraez I., Garcia-Perez R., Sharp A.J., Marques-Bonet T.: DNA methylation: insights into human evolution. *PLoS Genet.* DOI:10.1371/journal.pgen.1005661 (2015)
42. Hoare T.R., Kohane D.S.: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, **49**, 1993–2007 (2008)
43. Howe S.J., Thrasher A.J. i wsp.: Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J. Clin. Invest.* **118**, 3143–3150 (2008)
44. Hyde S.C., Gill D.R. i wsp.: CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat. Biotechnol.* **26**, 549–551 (2008)
45. Jiao S., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L., Wolff J.A.: Persistence of plasmid DNA and expression in rat brain cells *in vivo*. *Exp. Neurol.* **115**, 400–413 (1992)
46. Jones P.A., Takai D.: The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, **293**, 1068–1070 (2001)
47. Kitagawa T., Iwazawa T., Robbins P., Lotze M., Tahara H.: Advantages and limitations of particle-mediated transfection (gene gun) in cancer immuno-gene therapy using IL-10, IL-12 or B7-1 in murine tumor models. *J. Gene Med.* **5**, 958–965 (2003)
48. Koike H., Ishida A., Hayashi T., Shimamura M., Mizuno S., Nakamura T., Iida H., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R.: Injection of HGF plasmid cDNA to prevent manifestation of Parkinson disease: a preclinical study using a primate model. *Open Gene Ther. J.* **2**, 38–44 (2009)
49. Koike H., Morishita R., Iguchi S., Aoki M., Matsumoto K., Nakamura T., Yokoyama C., Tanabe T., Ogihara T., Kaneda Y.: Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene. *FASEB J.* **17**, 779–781 (2003)
50. Kosovac D., Wild J., Ludwig C., Meissner S., Bauer A.P., Wagner R.: Minimal doses of a sequence-optimized transgene mediate high-level and long-term EPO expression *in vivo*: challenging CpG-free gene design. *Gene Ther.* **18**, 189–198 (2011)
51. Krieg A.M.: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 709–760 (2002)
52. Krieg A.M., Wu T., Weeratna R., Efler S.M., Love-Homan L., Yang L., Yi A.K., Short D., Davis H.L.: Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12631–12636 (1998)
53. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**, 6546–6549 (1995)
54. Kukuła K., Rużyłło W. i wsp.: Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD). *Am. Heart J.* **161**, 581–589 (2011)
55. Lara A.R., Ramirez O.T.: Plasmid DNA production for therapeutic applications. *Methods Mol. Biol.* **824**, 271–303 (2012)
56. Larsen M.D., Griesenbach U., Goussard S., Gruenert D.C., Geddes D.M., Scheule R.K., Cheng S.H., Courvalin P., Grillo-Courvalin C., Alton E.W.: Bactofection of lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo* using a genetically modified *Escherichia coli*. *Gene Ther.* **15**, 434–442 (2008)

57. Lechardeur D., Sohn K.-J., Haardt M., Joshi P.B., Monck M., Graham R.W., Beatty B., Squire J., O'Brodovich H., Lukacs G.L.: Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* **6**, 482–497 (1999)
58. Loessner H., Endmann A., Leschner S., Westphal K., Rohde M., Miloud T., Hämmerling G., Neuhaus K., Weiss S.: Remote control of tumour-targeted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the use of L-arabinose as inducer of bacterial gene expression *in vivo*. *Cell Microbiol.* **9**, 1529–1537 (2007)
59. Madeira C., Rodrigues C.A., Reis M.S., Ferreira F.F., Correia R.E., Diogo M.M., Cabral J.M.: Nonviral gene delivery to neural stem cells with minicircles by microporation. *Biomacromolecules*, **14**, 1379–1387 (2013)
60. Magnusson T., Haase R., Schleef M., Wagner E., Ogris M.: Sustained, high transgene expression in liver with plasmid vectors using optimized promoter-enhanced combinations. *J. Gene Med.* **13**, 382–391 (2011)
61. Makino H., Aoki M., Hashiya N., Yamasaki K., Azuma J., Sawa Y., Kaneda Y., Ogihara T., Morishita R.: Long-term follow-up evaluation of results from clinical trial using hepatocyte growth factor gene to treat severe peripheral arterial disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2503–2509 (2012)
62. Marshall W.G., Boone B.A., Burgos J.D., Gografe S.I., Baldwin M.K., Danielson M.L., Larson M.J., Caretto D.R., Cruz Y., Ferraro B., Heller L.C., Ugen K.E., Jaroszeski M.J., Heller R.: Electroporation-mediated delivery of a naked DNA plasmid expressing VEGF to the porcine heart enhances protein expression. *Gene Ther.* **17**, 419–423 (2010)
63. Miao C.H., Thompson A.R., Loeb K., Ye X.: Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer *in vivo*. *Mol. Therapy*, **3**, 947–957 (2001)
64. Mitsui M., Nishikawa M., Zang L., Ando M., Hattori K., Takahashi Y., Watanabe Y., Takakura Y.: Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on the sustainability of transgene expression. *J. Gene Med.* **11**, 435–443 (2009)
65. Nafissi N., Alqawlaq S., Lee E.A., Foldvari M., Spagnuolo P.A., Slavcev R.A.: DNA ministrings: highly safe and effective gene delivery vectors. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, DOI: 10.1038/mtna.2014.16 (2014)
66. Nafissi N., Foldvari M.: Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools. *Front. Neurosci.* **9**, 355 DOI: 10.3389/fnins.2015.00355 (2015)
67. Nafissi N., Slavcev R.: Bacteriophage recombination systems and biotechnical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 2841–2851 (2014)
68. Oliveira P.H., Mairhofer J.: Marker-free plasmids for biotechnological applications-implications and perspectives. *Trends Biotechnol.* **31**, 539–547 (2013)
69. Palfy R., Hodossy J., Behuliak M., Resko P., Radvansky J., Celec P.: Bacteria in gene therapy: bactofection versus alternative gene therapy. *Gene Ther.* **13**, 101–105 (2006)
70. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F.: Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013)
71. Rauschhuber C., Noske N., Ehrhardt A.: New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 2–9 (2012)
72. Reyes-Sandoval A., Ertl H.C.: CpG methylation of a plasmid vector results in extended transgene product expression by circumventing induction of immune responses. *Mol. Ther.* **9**, 249–261 (2004)
73. Ropper A.H., Gorson K.C., Gooch C.L., Weinberg D.H., Pieczek A., Ware J.H., Kershen J., Rogers A., Simovic D., Schratzberger P., Kirchmair R., Losordo D.: Vascular endothelial growth factor gene transfer for diabetic polyneuropathy: a randomized, double-blinded trial. *Ann. Neurol.* **65**, 386–393 (2009)
74. Rosazza C., Buntz A., Ries T., Woll D., Zumbusch A., Rols M.P.: Intracellular tracking of single-plasmid DNA particles after delivery by electroporation. *Mol. Therapy*, **21**, 2217–2226 (2013)
75. Rosenberg S.A., Aebersold P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan R.A., Moen R., Karson E.M., Lotze M.T., Yang J.C., Topalian S.L., Merino M.J., Culver K., Miller A.D., Blaese R.M., Anderson W.F.: Gene transfer into humans — immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* **323**, 570–578 (1990)
76. Saeed M., Martin A., Ursell P., Do L., Bucknor M., Higgins C.B., Saloner D.: MR assessment of myocardial perfusion, viability, and function after intramyocardial transfer of VM202, a new plasmid human hepatocyte growth factor in ischemic swine myocardium. *Radiology*, **248**, 107–118 (2008)
77. Saitoh S-I., Miyake K.: Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol. Rev.* **227**, 32–43 (2009)
78. Sanchez-Romero M.A., Cota I., Casadesus J.: DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome. *Curr. Opin. Microbiol.* **25**, 9–16 (2015)
79. Smorawska M., Szuplewska M., Zaleski P., Wawrzyniak P., Maj A., Plucienniczak A., Bartosik D.: Mobilizable narrow host range plasmid as natural suicide vectors enabling horizontal gene transfer among distantly related bacterial species. *FEMS Microbiol. Lett.* **326**, 76–82 (2012)
80. Spanggaard L., Gehl J. I. wsp.: Gene electrotransfer of plasmid antiangiogenic metargidin peptide (AMEP) in disseminated melanoma: safety and efficacy results of a phase I first-in-man study. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **24**, 99–107 (2013)
81. Staworzyńska M.J., Stachowiak R., Bielecki J.: Zastosowanie wektorów bakteryjnych w biologii molekularnej i w medycynie. *Post. Mikrobiol.* **50**, 3–16 (2011)
82. Stuchbury G., Münch G.: Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. *Cytotechnology*, **62**, 189–194 (2010)
83. Takahashi Y., Nishikawa M., Takakura Y.: Development of safe and effective nonviral gene therapy by eliminating CpG motifs from plasmid DNA vector. *Front. Biosci.* **4**, 133–141 (2012)
84. Taniyama Y., Azuma J., Kunugiza Y., Iekushi K., Rakugi H., Morishita R.: Therapeutic option of plasmid-DNA based gene transfer. *Curr. Top. Med.Chem.* **12**, 1630–1637 (2012)
85. Thomas C.E., Ehrhardt A., Kay M.A.: Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–358 (2003)
86. Tokunaga T., Suganuma T. i wsp.: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer. Inst.* **72**, 955–962 (1984)
87. Tomizawa M., Shinozaki F., Motoyoshi S., Sugiyama T., Yamamoto S., Sueishi M.: Sonoporation: gene transfer using ultrasound. *World J. Methodol.* **3**, 39–44 (2013)
88. Tros de Ilarduya C., Sun Y., Düzgüneş N.: Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**, 159–170 (2010)
89. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (FDA): Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy. (1998)
90. Vandermeulen G., Marie C., Scherman C., Preat V.: New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Mol. Therapy*, **19**, 1942–1949 (2011)
91. Vaughan E.E., Geiger R.C., Miller A.M., Loh-Marley P.L., Suzuki T., Miyata N., Dean D. A.: Microtubule acetylation

- through HDAC6 inhibition results in increased transfection efficiency. *Mol. Ther.* **16**, 1841–1847 (2008)
92. Villate-Beitia I., Puras G., Zarate J., Agirre M., Ojeda E., Pedraz J.L.: First insights into non-invasive administration routes for non-viral gene therapy (w) *Gene Therapy – Principles and Challenges*, red. D. Hashad, InTech, Rijeka, 2015, s. 145–177
93. von Groll A., Levin Y., Barbosa M.C., Ravazzolo A.P.: Linear DNA Low Efficiency Transfection by Liposome Can Be Improved by the Use of Cationic Lipid as Charge Neutralizer. *Biotechnol. Prog.* **22**, 1220–1224 (2006)
94. Wang W., Li W., Ma N., Steinhoff G.: Non-viral gene delivery methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **14**, 46–60 (2013)
95. WHO Expert Committee on Biological Standardization, 66<sup>th</sup> Report, Annex 2. WHO Press, Geneva, 2015, s. 93–130
96. Wirth T., Parker N., Yla-Herttuala S.: History of gene therapy. *Gene*, **525**, 162–169 (2013)
97. Wolff J.A., Ludtke J., Acsadi G., Williams P., Jani A.: Long-term persistence and plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 363–369 (1992)
98. Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L.: Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, **247**, 1465–1468 (1990)
99. Wooddell C.I., Subbotin V.M., Sebestyén M.G., Griffin J.B., Zhang G., Schleef M., Braun S., Huss T., Wolff J.A.: Muscle damage after delivery of naked plasmid DNA into skeletal muscles is batch dependent. *Human Gene Therapy*, **22**, 225–235 (2011)
100. Wright O., Stan G-B., Ellis T.: Building-in biosafety for synthetic biology. *Microbiology*, **159**, 1221–1235 (2013)
101. Yew N.S., Zhao H., Przybylska M., Wu I-H., Tousignant J. D., Scheule R.K., Cheng S, H. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression *in vivo*. *Mol. Therapy*, **5**, 731–738 (2002)
102. Yew N.S., Zhao H., Wu H-L, Song A., Tousignant J.D., Przybylska M., Cheng S.H.: Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol. Therapy*, **1**, 255–262 (2000)
103. Zhang G., Song Y.K., Liu D.: Long-term expression of human alpha 1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther.* **7**, 1344–1349 (2000)
104. Zhang H.Y., Sun S.H., Guo Y.J., Chen Z.H., Huang L., Gao Y.J., Wan B., Zhu W.J., Xu G.X., Wang J.J.: Tissue distribution of a plasmid DNA containing epitopes of foot-and-mouth disease virus in mice. *Vaccine*, **23**, 5632–5640 (2005)

Jagoda Płaczkiwicz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii,  
Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w grudniu 2016 r.  
Zaakceptowano w lutym 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Udział białek wielofunkcyjnych w bakteryjnej patogenezie. 3. Wpływ białek wielofunkcyjnych na układ odpornościowy. 4. Obecność białek wielofunkcyjnych u bakterii kwasu mlekowego. 5. Transport białek wielofunkcyjnych na powierzchnię komórek bakteryjnych. 6. Ewolucja białek wielofunkcyjnych. 7. Wykrywanie białek wielofunkcyjnych. 8. Podsumowanie

### Bacterial moonlighting proteins

**Abstract:** Existence of moonlighting proteins in microorganisms is a known phenomenon, yet still not well understood. Moonlighting proteins have at least two independent biological functions, which must be performed by one polypeptide chain without separation into protein domains. Most of these proteins, beside their role in the cytoplasm, play an important role outside of the cell i.e. they take part in the process of pathogenesis by binding and activating host's plasminogen. The existence of moonlighting proteins complicates the understanding of pathogenicity and virulence of many common bacteria as well as their role in commensal bacteria. Many of moonlighting proteins occurring in commensal bacteria appear to perform similar functions to proteins discovered in pathogenic bacteria, e.g. binding extracellular matrix. Moonlighting proteins found in bacteria are mostly housekeeping enzymes, especially from the glycolytic pathway, such as enolase, aldolase, dehydrogenase as well as heat-shock proteins and transcriptional factors.

1. Introduction. 2. Involvement of moonlighting proteins in bacterial pathogenesis. 3. Effect of moonlighting proteins on the immune system. 4. Moonlighting proteins in lactic acid bacteria. 5. Transportation of moonlighting proteins to the bacterial surface. 6. Evolution of moonlighting proteins. 7. Detection of moonlighting proteins. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** bakteryjna patogeneza, białka wielofunkcyjne, enzymy

**Key words:** bacterial pathogenesis, moonlighting proteins, enzymes

## 1. Wprowadzenie

Zjawisko występowania białek wielofunkcyjnych u mikroorganizmów jest zjawiskiem powszechnym, jednak wciąż niedokładnie poznanym. Z roku na rok pojawiają się liczne nowe doniesienia dostarczające niezwykle interesujących informacji dotyczących tych białek. Wyniki wykazujące, że jedno białko może pełnić wiele funkcji biologicznych opublikowane zostały po raz pierwszy w 1989 roku, a zjawisko to początkowo określano terminem „gene sharing” [40]. W 1999 roku Constance Jeffery dokładnie zdefiniowała cechy takich białek i wprowadziła stosowany powszechnie do dziś termin białek wielofunkcyjnych (moonlighting proteins) [20]. Białka wielofunkcyjne to białka, które pełnią co najmniej dwie niezależne od siebie funkcje biologiczne. Funkcje te muszą być pełnione przez jeden łańcuch polipeptydowy bez podziału na domeny białkowe. Wyklucza to jednoznacznie białka homologiczne, białka powstające na skutek fuzji genów, alternatywnego splicingu lub proteolizy. Jeffery opisała również przykłady mechanizmów, za pomocą których białka te mogą pełnić kilka funkcji, m.in. różny poziom ekspresji genów kodujących te białka, różna lokalizacja subkomórkowa,

oligomeryzacja lub w przypadku enzymów zmiana stężenia substratu, kofaktora lub produktu [20]. Obecnie internetowa baza danych MoonProt [32] zawiera 291 (czerwiec 2016) opisanych i eksperymentalnie zweryfikowanych białek wielofunkcyjnych, występujących m.in. u zwierząt, roślin, bakterii lub drożdży. Pierwszym białkiem wielofunkcyjnym, którego występowanie wykazano u bakterii była dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) *Streptococcus pyogenes*. Po wykazaniu, że GAPDH będąca enzymem szlaku glikolizy, oddziałuje z fibronektyną oraz białkami cytoszkieletu aktyną i miozyną, stało się oczywiste, że to białko wielofunkcyjne może uczestniczyć w kolonizacji gospodarza przez paciorkowce grupy A [37].

## 2. Udział białek wielofunkcyjnych w bakteryjnej patogenezie

Narastająca wśród bakterii patogennych wielolekooporność skłania badaczy do poszukiwania alternatywnych sposobów walki z tymi mikroorganizmami. Niewątpliwie pogłębianie wiedzy na temat białek wielofunkcyjnych obecnych na powierzchni komórek

\* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 554 14 19; e-mail: j.placzkiwicz@biol.uw.edu.pl



bakteryjnych może okazać się jednym ze sposobów na stawienie czoła temu problemowi. Białka wielofunkcyjne uczestniczące w bakteryjnej patogenezie to przede wszystkim enzymy szlaków metabolicznych, głównie glikolizy, takie jak m.in. enolaza, aldolaza czy wspomniana wcześniej GAPDH, jak również białka opiekuńcze [32]. Większość spośród tych białek poza funkcją w cytoplazmie, pełni również istotną rolę na powierzchni komórki bakteryjnej uczestnicząc w patogenezie poprzez wiązanie i aktywację plazminogenu gospodarza [33]. Plazminogen w wyniku aktywacji poprzez bakteryjne streptokinazy i stafylokinazy przekształcany jest w aktywną formę – plazminę, której jedną z funkcji jest degradacja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błony podstawnej, w tym lamininy, fibryny i fibrynogenu [4, 42]. Dodatkowo plazmina oraz plazminogen regulują dwa istotne systemy u kręgowców: kaskadę krzepnięcia i układ dopełniacza. Ułatwia to patogenom przetrwanie w organizmie gospodarza i skuteczną ucieczkę przed jego układem odpornościowym [4].

### 3. Wpływ białek wielofunkcyjnych na układ odpornościowy

Szereg zewnątrzkomórkowych białek bakteryjnych, określanych terminem VIP (Virulence-Associated Immunomodulatory Proteins) oddziałuje z układem odpornościowym gospodarza. Również bakteryjne białka wielofunkcyjne wykazują taką zdolność. Wyizolowane z podłoża, w którym hodowane były bakterie *Streptococcus agalactiae* białko wielofunkcyjne – GAPDH aktywowało limfocyty B do proliferacji i różnicowania [31].

Warianty immunologiczne otoczkowych polisacharydów *Staphylococcus pneumoniae* powszechnie stosowane są do typowania klinicznych izolatów tej bakterii. Analiza immunogennych białek ściany komórkowej *S. pneumoniae* za pomocą techniki spektrometrii mas MALDI-TOF wykazała w otoczkach obecność m.in. enzymów szlaku glikolizy, białek zaangażowanych w syntezę białek, oraz jednego białka opiekuńczego DnaK. Myszy BALB/c, immunizowano wybranymi rekombinowanymi białkami wielofunkcyjnymi, co skutkowało pojawieniem się przeciwciał przeciwko tym białkom, jak również przedłużało żywotność zwierząt immunizowanych przed infekcją *S. pneumoniae* szczepu WU1 [30].

Pałeczka *Aeromonas salmonicida* jest czynnikiem etiologicznym furunkulozy – choroby ryb powodującej olbrzymie straty ekonomiczne wśród hodowców, co związane jest z śmiertelnością ryb oraz ze zwiększonym zużyciem antybiotyków [19]. Większość badań nad szczepionkami wykorzystuje osady bakteryjne

inaktywowane formaliną, przez co usuwana zostaje bakteryjna frakcja zewnątrzkomórkowa. Analizy proteomiczne *A. salmonicida* wykazały natomiast, że liczna grupa wielofunkcyjnych białek, które lokalizują się na powierzchni ściany komórkowej ma właściwości immunogenne [48]. Przykłady przedstawione w tym punkcie przedstawiają perspektywę wykorzystania białek wielofunkcyjnych, jako potencjalnych celów działania szczepionek.

### 4. Obecność białek wielofunkcyjnych u bakterii kwasu mlekowego

Początkowo badania dotyczące białek wielofunkcyjnych ograniczały się do ich udziału w bakteryjnej patogenezie. Jednakże stopniowo pojawiające się doniesienia na temat ich obecności u bakterii kwasu mlekowego dostarczają zaskakujących informacji. Wiele z białek wielofunkcyjnych występujących u gatunków komensalnych okazuje się pełnić zbliżone funkcje do tych odkrytych u bakterii patogennych, jak np. oddziaływanie z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, czy plazminogenu [3, 10]. Podobnie jest również w przypadku udziału tych białek w adhezji do komórek nabłonkowych, czy komórek błon śluzowych gospodarza. Czynniki elongacyjne Tu (EL-Tu) oraz białko szoku cieplnego GroEL laseczki kwasu mlekowego *Lactobacillus johnsonii* La1, uczestniczą w adhezji tej bakterii do komórek nabłonkowych oraz do komórek błony śluzowej jelita [5, 16]. GAPDH zlokalizowana na powierzchni *Lactobacillus plantarum* również wykazuje zdolność wiązania do powierzchni błony śluzowej jelita grubego. Usunięcie białek powierzchniowych tych bakterii skutkuje spadkiem adhezji badanych laseczek do ludzkich komórek nabłonkowych okrężnicy linii Caco-2 o 40% [26]. Jako, że GAPDH jest białkiem wielofunkcyjnym charakterystycznym również dla patogenów, możliwe jest, że dochodzi do konkurencji o miejsca wiązania na powierzchni komórek nabłonkowych z bakteriami patogennymi. Potwierdziły to wyniki badań, w których wykazano, że kolonizacja komórek Caco-2 przez *L. plantarum*, w znacznym stopniu zapobiega adhezji patogenów takich jak *Clostridium sporogenes* i *Enterococcus faecalis* [41]. Również białka wielofunkcyjne obecne na powierzchni komensalnej bakterii żeńskich dróg rodnych *Lactobacillus jensenii* wykazują zdolność hamowania adhezji bakterii patogennych [45]. Kluczowym etapem infekcji *Neisseria gonorrhoeae* jest adhezja do komórek nabłonkowych [18]. Enolaza uwolniona przez *L. jensenii* do supernatantu (RSC- released surface components), hamuje adhezję *N. gonorrhoeae* do ludzkich komórek nabłonkowych endometrium linii Hec-1-B. Procent komórek patogenu ulegających adhezji jest skorelowany ze stężeniem rekombinowanej enolazy

i może zmniejszać się nawet czterokrotnie. Borgdorff i wsp. wykazali obecność licznych białek wielofunkcyjnych, a przede wszystkim GAPDH i GPI *Lactobacillus iners* i *Lactobacillus crispatus* w materiale pobranym z dróg rodnych rwandyjskich kobiet narażonych na infekcję wirusem HIV [7]. W przypadku *L. iners* zaobserwowano znaczący spadek ilości tych białek w preparatach od kobiet z dysbiozą naturalnej mikroflory, podobną zależność zaobserwowano również dla *L. crispatus*, lecz w mniejszym stopniu. Według badaczy wyniki mogą świadczyć o strategii przetrwania bakterii komensalnych, które utrzymują wewnątrzkomórkowo w warunkach dysbiozy istotne enzymy metabolizmu podstawowego. Jednakże prowadzić to może do całkowitego wyparcia tych bakterii przez gatunki patogenne. Prawdopodobna wydaje się być również hipoteza, iż duża obecność białek wielofunkcyjnych w środowisku skutkuje przetrwaniem naturalnej mikroflory, tym samym mniejsza ilość tych białek prowadzić może do dysbiozy. Z kolei Kainulainen i wsp. wykazali, iż to warunki stresu komórkowego jak np. zmiana pH z kwasowego na zasadowe skutkuje uwolnieniem bakterierynych białek wielofunkcyjnych z powierzchni *L. crispatus* do otoczenia [24].

Oddziaływania z plazminogenem są charakterystyczną cechą patogennych bakterii takich jak np. *Escherichia coli* [38], czy *Listeria monocytogenes* [43], umożliwiającą im skuteczną kolonizację infekowanej niszy. Również enolaza *Bacteroides fragilis* będącego powszechną bakterią komensalną mikrobiomu układu pokarmowego człowieka, wywołującego częste zakażenia oportunistyczne posiada zdolność oddziaływania z plazminogenem [44]. Białka wielofunkcyjne licznych gatunków z rodzaju *Bifidobacterium*, stanowiących prawie 3% całkowitej mikroflory jelitowej człowieka, również wykazują zdolność wiązania plazminogenu [9]. Ponieważ patogeny i bakterie symbiotyczne ludzkiego przewodu pokarmowego zasiedlają tę samą niszę ekologiczną prawdopodobne jest, że łączą je podobne mechanizmy kolonizacji związane m.in. ze zdolnością wiązania plazminogenu.

## 5. Transport białek wielofunkcyjnych na powierzchnię komórek bakterierynych

Bakteryjna błona cytoplazmatyczna mimo bardzo dynamicznej struktury jest nieprzepuszczalna dla cząsteczek posiadających ładunek oraz większych niż 100 Da. Większość białek transportowanych na powierzchnię komórki bakterierynej zawiera N-końcową sekwencję sygnałową [13]. Tym bardziej interesujący jest fakt, że dla większości białek wielofunkcyjnych wykazano brak obecności znanej sekwencji sygnałowej. Potwierdziła to analiza bioinformatyczna z wykorzy-

staniem narzędzi takich jak SignalIP, czy Psort przeprowadzona dla 98 białek wielofunkcyjnych różnych organizmów. W żadnym z rozpatrywanych przypadków nie dowiedziono obecności sekwencji sygnałowej [2]. Dysmutaza ponadtlenkowa *Mycobacterium tuberculosis* oraz białka wielofunkcyjne *L. monocytogenes*: GroEL i izomeraza fosfomannozy są jedynymi białkami pozbawionymi znanej sekwencji sygnałowej, których transport przez błonę komórkową został wyjaśniony [8, 29]. Zaangażowany w ten proces jest system sekrecji Sec, który jest silnie konserwowany wśród bakterii. Białka transportowane przez ten system jak np. autolizyny zawierają klasyczną N-końcową sekwencję sygnałową [12]. Według autora badań dotyczących *L. monocytogenes*, transport białek GroEL i izomerazy fosfomannozy związany może być właśnie z aktywnością autolizyn. Wykazano, że autolizyny uczestniczą w eksporcie elementów rzęski na powierzchnię komórki bakterierynej prawdopodobnie poprzez tworzenie porów w ścianie komórkowej [34]. Niewykluczone jest, że transport białek wielofunkcyjnych *L. monocytogenes* związany jest z aktywnością autolizyn tworzących miejsca w ścianie komórkowej, przez które białka te mogłyby przedostać się na powierzchnię komórki [29].

W 2010 roku Pasztor wraz z współpracownikami na podstawie badań białek wielofunkcyjnych *Staphylococcus aureus* postawił hipotezę, iż to liza komórek bakterierynych może prowadzić do uwolnienia tych białek do supernatantu. Następnie białka te miałyby ulec asocjacji na powierzchni sąsiadujących bakterii. Badacze wykazali, że mutacja w genie kodującym główną hydrolazę peptydoglikanu *S. aureus* – Atl skutkuje spadkiem obecności w sekretomie 22 białek cytoplazmatycznych [39]. Z kolei w 2012 roku opublikowane zostały wyniki badań demonstrujących zdolność GAPDH *Streptococcus agalactiae* do wiązania się z powierzchnią licznych, nawet filogenetycznie odległych bakterii [35]. Zaobserwowano również zależność pomiędzy spadkiem lizy badanych komórek bakterierynych, a spadkiem ilości GAPDH w supernatancie, co było zgodne z doniesieniami Pasztor i wsp. [39].

Opierając się na doniesieniach, że liza komórki jest efektywnym mechanizmem dostarczania elementów cytoplazmatycznych do środowiska, również badania dotyczące biofilmów bakterierynych zaczęły skupiać się na tym zjawisku. Analizy biofilmów *P. aeruginosa* wykazały, że liza komórek bakterierynych zachodzi na skutek ekspresji genu kodującego endolizynę (*lys*). Dodatkowo zaobserwowano, że liza komórki bakterierynej jest mechanizmem sprzyjającym biogenezie pęcherzyków błonowych. Pęcherzyki tworzące się z fragmentów błony rozpadającej się komórki prawdopodobnie wyłapują uwolnione komponenty cytoplazmatyczne. Mimo że biogeneza pęcherzyków w wyniku lizy komórki bakterierynej nie jest zjawiskiem precyzyjnie kontrolowanym,

może stanowić kolejny poznany mechanizm transportu białek wielofunkcyjnych [47].

Jednakże doniesienia dotyczące transportu białek wielofunkcyjnych na powierzchnie komórki są często sprzeczne, co świadczy o tym, że w proces ten zaangażowanych może być wiele mechanizmów. W 2015 roku Ebner oraz współpracownicy wykazali, że aldolaza oraz enolaza *S. aureus* najprawdopodobniej nie wiążą się z powierzchnią komórek bakteryjnych na skutek lizy. W fazie eksponentialnej wzrostu, gdzie liczba lizujących komórek jest najmniejsza, zaobserwowano największą liczbę tych białek na powierzchni komórki w porównaniu z innymi fazami wzrostu [13].

## 6. Ewolucja białek wielofunkcyjnych

Wiele z poznanych białek wielofunkcyjnych jest enzymami silnie konserwowanymi ewolucyjnie. Przypuszcza się, że 7 z 10 białek glikolizy oraz 7 z 8 Cyklu Krebsa pełni dodatkową funkcję [46]. Dodatkowe funkcje zdają się występować częściej w białkach, w których kodujące je geny ulegają konstytutywnej ekspresji. Może to być jednak związane z faktem, że konserwowane ewolucyjnie geny obecne są w wielu różnych organizmach, tym samym wyższa jest szansa na identyfikację nowej funkcji [14].

Istnienie białek wielofunkcyjnych tłumaczyć może teoria mówiąca, że nie ma żadnego końcowego celu w ewolucji, a nowe funkcje rozwijają się jedynie przez adaptację już istniejących. Jeżeli konkretna nowa funkcja białka skutkuje korzyścią dla organizmu, to funkcja ta będzie podlegać selekcji w trakcie ewolucji [15]. Zaskakująco nawet niewielka mutacja może skutkować zmianą funkcji. *Enterobacter aerogenes* produkuje paralizującą toksynę wykorzystywaną przez drapieżne larwy mrówkolwów z rodziny *Myrmeleontidae*. Okazało się, że toksyna ta produkowana przez *E. aerogenes* jest homologiem białka opiekuńczego GroEL *E. coli*, niewykazującego właściwości toksycznych. Substytucja jedynie 4 aminokwasów w sekwencji aminokwasowej toksycznego białka *E. aerogenes* skutkowałą znacznym spadkiem jego toksyczności [49].

Wzór ekspresji genów niezbędny dla jednej funkcji może być niezbyt idealny dla drugiej. W takiej sytuacji dystrybuowanie oryginalnej oraz dodatkowej funkcji białka wielofunkcyjnego na dwa geny w wyniku duplikacji może być bardzo korzystne, co zostało szerzej omówione w doskonałej pracy przeglądowej autorstwa Huberts oraz van der Klei [17]. Analizując strukturę białka, druga funkcja może być rezultatem nowego wykorzystania istniejącego miejsca wiązania lub modyfikacji regionów nieużywanych. Przykładem może być izomeraza glukozy-6-fosforanu, której sekwencja aminokwasowa miejsca aktywnego jest silnie

konserwowana wśród licznych gatunków. Natomiast w pozostałej części enzymu występują liczne kieszonki, pętle oraz inne struktury, które przez miliardy lat ewolucji mogły z łatwością wytworzyć własne, dodatkowe miejsce aktywne zapewniając tym białkom dodatkową funkcję [23].

## 7. Wykrywanie białek wielofunkcyjnych

Białka wielofunkcyjne stanowią olbrzymie wyzwanie dla badaczy. Utrudnieniem jest fakt, że białka homologiczne często nie są wielofunkcyjne. Ogromna liczba poznanych sekwencji białkowych oraz zwiększająca się dostępność technik umożliwiających analizę wielu białek jednocześnie zapoczątkowała rosnące zainteresowanie proteomiką – również w celu wykrywania białek wielofunkcyjnych. Projekty proteomiczne angażujące biochemiczne, genetyczne oraz bioinformatyczne techniki mogą determinować cechy setek, a nawet tysięcy białek podczas jednej analizy, nie opierając się na wcześniej oszacowanych danych. Modele ewolucji białek wielofunkcyjnych, można zastosować dla wielu białek. Sugeruje to, że obecna liczba poznanych i eksperymentalnie zweryfikowanych białek wielofunkcyjnych prawdopodobnie reprezentuje niewielki odsetek tych, które rzeczywiście istnieją. Stąd wyniki dostarczające informacji na temat lokalizacji, interakcji z innymi cząsteczkami, czy wynikających z mutacji w genach niespodziewanych fenotypów, mogą być często klasyfikowane jako wyniki fałszywie pozytywne.

Pierwszą wysokoprzepustową próbą identyfikacji dodatkowych funkcji znanych białek była przeprowadzona w 2015 roku analiza w oparciu o sieci oddziaływań pomiędzy białkami (PPIs – protein-protein interactions) w ludzkim interaktomie. Zidentyfikowano 430 konserwowanych ewolucyjnie białek określonych terminem EMFs (Extreme Multifunctional Proteins), charakteryzujących się określonym zestawem cech, w tym m.in. względnie stałą ekspresją genów kodujących te białka lub dużą liczbą interaktorów. Autorzy podkreślają, że białka EMF nie spełniają wszystkich kryteriów białek wielofunkcyjnych natomiast istnieje duże prawdopodobieństwo, że białka wielofunkcyjne stanowią podgrupę białek EMF [11].

Analizę porównawczą 11 narzędzi bioinformatycznych do przewidywania funkcji białek wielofunkcyjnych przeprowadził Gomez wraz ze współpracownikami, czego wynikiem było wskazanie platformy PSI-BLAST, jako relatywnie dobrej [1]. W oszacowywaniu funkcji na podstawie odległych sekwencji wykorzystywane jest również narzędzie PFP [25]. Jeffery, będąca autorką terminu „moonlighting proteins” oraz wieloletnią badaczką tego zjawiska postanowiła wykorzystując analizy bioinformatyczne ocenić czy białka

te wykazują podobne cechy fizyczne. Analiza 98 białek wielofunkcyjnych różnych gatunków dotyczyła określenia punktu izoelektrycznego, składu aminokwasowego, indeksu alifatyczności oraz GRAVY (Grand Average of Hydrophaty) [28]. Wykorzystano w tym celu program Protparam [6], dzięki czemu udało się określić liczne wspólne cechy fizyczne tych białek. W większości białka wielofunkcyjne występujące na powierzchni komórek posiadają istotne cechy typowych białek wewnątrzkomórkowych. Autorzy postawili hipotezę, że wielofunkcyjność może być powszechną cechą białek, a przeprowadzona analiza umożliwi ich łatwiejszą identyfikację [2].

Spektrometria mas oraz dwuwymiarowa elektroforeza żelowa są bardzo dobrymi technikami służącymi do identyfikacji białek obecnych w tkankach, czy w różnych przedziałach subkomórkowych. W związku z tym spektrometria mas może stanowić istotną technikę wykrywania białek wielofunkcyjnych, gdyż obecność białek w niespodziewanej lokalizacji komórkowej, czy kompleksie białkowym sugeruje, że białko to prawdopodobnie posiada drugą funkcję [22]. Analiza elektroforetyczna 2D-DIGE białka LuxS, będącego autoinduktorem w zjawisku quorum sensing *Salmonella Typhimurium* wykazała, że białko to ulega modyfikacji potranslacyjnej. Na podstawie tych wyników przeprowadzono dalsze analizy, które potwierdzały przypuszczenia badaczy, że białko to lokalizuje się również po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. Fakt, że zewnętrzne białko LuxS pozbawione było typowej sekwencji sygnałowej pozwala przypuszczać, że zostało odkryte nowe białko wielofunkcyjne o nieznanym celu. Przykład ten pokazuje w jaki sposób wysokoprętościowe analizy elektroforetyczne mogą posłużyć do wykrywania nowych białek wielofunkcyjnych [27]. Również określone za pomocą promieniowania rentgenowskiego struktury krystaliczne białek wielofunkcyjnych pomogły w zrozumieniu w jaki sposób białka te mogą posiadać dwie funkcje w zależności od warunków środowiskowych lub komórkowych [21].

Interakcję białek wielofunkcyjnych z innymi cząsteczkami (białkami, przeciwciałami, peptydami) *in vitro* badać można z wykorzystaniem mikromacierzy białkowych. Nową strategią poszukiwania dodatkowych funkcji enzymów jest porównywanie fenotypu w szczepach, w których enzym został inaktywowany przez mutację punktową ze szczepami, w których przeprowadzono delecję całego genu. W przypadku genów kodujących białka wielofunkcyjne powinna występować rozbieżność w fenotypach [17]. Obecność białek wielofunkcyjnych wykazano również u organizmów eukariotycznych, w tym u drożdży. Mutacja w genie kodującym dekarboksylazę pirogronianową drożdży szczepu *Hansenula polymorpha* skutkuje akumulacją nieaktywnych monomerów oksydazy alkoholowej

w cytoplazmie. Takie odkrycie sugeruje, że dekarboksylaza pirogronianowa jest białkiem wielofunkcyjnym, a druga funkcja związana jest z gromadzeniem oksydazy alkoholowej [36].

## 8. Podsumowanie

Obecnie trudno jest oszacować jak powszechne są białka wielofunkcyjne. Zwiększająca się liczba doniesień na temat ich kluczowej roli w bakteryjnej patogenezie stanowi jednocześnie olbrzymią możliwość, jak i wyzwanie dla współczesnej biologii molekularnej, biotechnologii i medycyny. Profesor Dame Sally Davies naczelny lekarz Wielkiej Brytanii w swoim raporcie przedstawiła skutki narastającej oporności na antybiotyki, tym samym nawołując m. in. WHO do podjęcia walki z tym kryzysem. Podstawą dla potencjalnego wykorzystania białek wielofunkcyjnych jest dokładne ich poznanie. Badacze muszą poszerzyć dotychczasową wiedzę na temat struktury, nowych funkcji, mechanizmów transportu na powierzchnię komórki bakteryjnej, ewolucji, czy roli bakterii komensalnych. Dodatkowo ze względu na różnorodność białek wielofunkcyjnych wśród bakterii, istotne jest aby możliwie jak najdokładniej scharakteryzować udział w patogenezie w różnych warunkach, dla różnych gatunków. Istotne może okazać się również badanie interakcji pomiędzy białkami wielofunkcyjnymi obecnymi na powierzchni ludzkich komórek, bakterii komensalnych, czy innych bakterii patogennych z tymi obecnymi u analizowanego gatunku. Z pewnością rozwój proteomiki oraz poznanie większej ilości białek wielofunkcyjnych pozwoli na ich lepszą systematykę, jednocześnie stanowiąc podstawę do stworzenia baz danych, które mogłyby ułatwić dalsze badania.

## Piśmiennictwo

1. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997)
2. Amblee V., Jeffery C.J.: Physical features of intracellular proteins that moonlight on the cell surface. *PLoS One*, **10**, e0130575 (2015)
3. Antikainen J., Kuparinen V., Lähteenmäki K., Korhonen T.K.: Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**, 526–534 (2007)
4. Barthel D., Schindler S., Zipfel P.F.: Plasminogen is a complement inhibitor. *J. Biol. Chem.* **287**, 18831–18842 (2012)
5. Bergonzelli G.E., Granato D., Pridmore R.D., Marvin-Guy L.F., Donnicola D., Corthésy-Theulaz I.E.: GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **74**, 425–434 (2006)

6. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000)
7. Borgdorff H., Armstrong S.D., Tytgat H.L., Xia D., Ndayisaba G.F., Wastling J.M., van de Wijgert J.H.: Unique insights in the cervicovaginal *Lactobacillus iners* and *L. crispatus* proteomes and their associations with microbiota dysbiosis. *PLoS One*, **11**, e0150767 (2016)
8. Braunstein M., Espinosa B.J., Chan J., Belisle J.T., Jacobs W.R.: SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **48**, 453–464 (2003)
9. Candela M., Bergmann S., Vici M., Vitali B., Turrone S., Eikmanns B.J., Hammerschmidt S., Brigidi P.: Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J. Bacteriol.* **189**, 5929–5936 (2007)
10. Castaldo C., Vastano V., Siciliano R.A., Candela M., Vici M., Muscariello L., Marasco R., Sacco M.: Surface displaced alpha-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb. Cell Fact.* **8**, 14 (2009)
11. Chapple C. E., Robisson B., Spinelli L., Guien C., Becker E., Brun C.: Extreme multifunctional proteins identified from a human protein interaction network. *Nat. Commun.* **6**, 7412 (2015)
12. Danese P.N., Silhavy T.J.: Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 59–94 (1998)
13. Ebner P., Rinker J., Götz F.: Excretion of cytoplasmic proteins in *Staphylococcus* is most likely not due to cell lysis. *Curr. Genet.* **62**, 19–23 (2016)
14. Fothergill-Gilmore L.A., Michels P.A.: Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 105–235 (1993)
15. Gancedo C., Flores C.L.: Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 197–210 (2008)
16. Granato D., Bergonzelli G.E., Pridmore R.D., Marvin L., Rouvet M., Corthésy-Theulaz I.E.: Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.* **72**, 2160–2169 (2004)
17. Huberts D.H., van der Klei I.J.: Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 520–525 (2010)
18. Hung M.C., Christodoulides M.: The biology of *Neisseria* adhesins. *Biology (Basel)*, **2**, 1054–1109 (2013)
19. Janda J.M., Abbott S.L.: The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 35–73 (2010)
20. Jeffery C.J.: Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8–11 (1999)
21. Jeffery C.J.: Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 663–668 (2004)
22. Jeffery C.J.: Mass spectrometry and the search for moonlighting proteins. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 772–782 (2005)
23. Jeffery C.J., Bahnson B.J., Chien W., Ringe D., Petsko G.A.: Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator. *Biochemistry*, **39**, 955–964 (2000)
24. Kainulainen V., Loimaranta V., Pekkala A., Edelman S., Antikainen J., Kylväjä R., Laakkonen M., Laakkonen L., Finne J., Korhonen T. K.: Glutamine synthetase and glucose-6-phosphate isomerase are adhesive moonlighting proteins of *Lactobacillus crispatus* released by epithelial cathelicidin LL-37. *J. Bacteriol.* **194**, 2509–2519 (2012)
25. Khan I., Chitale M., Rayon C., Kihara D.: Evaluation of function predictions by PFP, ESG, and PSI-BLAST for moonlighting proteins. *BMC Proc.* **6**, Suppl. 7, S5 (2012)
26. Kinoshita H., Saito T. i wsp.: Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1667–1674 (2008)
27. Kint G., Sonck K.A., Schoofs G., De Coster D., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.: 2D proteome analysis initiates new insights on the *Salmonella Typhimurium* LuxS protein. *BMC Microbiol.* **9**, 198 (2009)
28. Kyte J., Doolittle R.F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132 (1982)
29. Lenz L.L., Mohammadi S., Geissler A., Portnoy D.A.: SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12432–12437 (2003)
30. Ling E., Feldman G., Portnoi M., Dagan R., Overweg K., Mulholland F., Chalifa-Caspi V., Wells J., Mizrahi-Nebenzahl Y.: Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* **138**, 290–298 (2004)
31. Madureira P., Ferreira P. i wsp.: *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J. Immunol.* **178**, 1379–1387 (2007)
32. Mani M., Chen C., Amblee V., Liu H., Mathur T., Zwicke G., Zabad S., Patel B., Thakkar J., Jeffery C. J.: MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight. *Nucleic Acids Res.* **43**, D277–282 (2015)
33. Matta S.K., Agarwal S., Bhatnagar R.: Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 2111–2120 (2010)
34. Nambu T., Minamino T., Macnab R.M., Kutsukake K.: Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**, 1555–1561 (1999)
35. Oliveira L., Madureira P., Andrade E.B., Bouaboud A., Morello E., Ferreira P., Poyart C., Trieu-Cuot P., Dramsi S.: Group B *Streptococcus* GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages. *PLoS One*, **7**, e29963 (2012)
36. Ozimek P., van Dijk R., Latchev K., Gancedo C., Wang D.Y., van der Klei I.J., Veenhuis M.: Pyruvate carboxylase is an essential protein in the assembly of yeast peroxisomal oligomeric alcohol oxidase. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 786–797 (2003)
37. Pancholi V., Fischetti V.A.: A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**, 415–426 (1992)
38. Parkkinen J., Korhonen T.K.: Binding of plasminogen to *Escherichia coli* adhesion proteins. *FEBS Lett.* **250**, 437–440 (1989)
39. Pasztor L., Götz F. i wsp.: Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins. *J. Biol. Chem.* **285**, 36794–36803 (2010)
40. Piatigorsky J., Wistow G.J.: Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell*, **57**, 197–199 (1989)
41. Ramiah K., van Reenen C.A., Dicks L.M.: Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res. Microbiol.* **159**, 470–475 (2008)

42. Sazonova I.Y., Houg A.K., Chowdhry S.A., Robinson B.R., Hedstrom L., Reed G.L.: The mechanism of a bacterial plasminogen activator intermediate between streptokinase and staphylokinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 12609–12613 (2001)
43. Schaumburg J., Diekmann O., Hagendorff P., Bergmann S., Rohde M., Hammerschmidt S., Jänsch L., Wehland J., Käst U.: The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics*, **4**, 2991–3006 (2004)
44. Sijbrandi R., Den Blaauwen T., Tame J.R., Oudega B., Luirink J., Otto B.R.: Characterization of an iron-regulated alpha-enolase of *Bacteroides fragilis*. *Microbes Infect.* **79**–18 (2005)
45. Spurbeck R.R., Arvidson C.G.: *Lactobacillus jensenii* surface-associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**, 3103–3111 (2010)
46. Sriram G., Martinez J.A., McCabe E.R., Liao J.C., Dipple K.M.: Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 911–924 (2005)
47. Turnbull L., Whitchurch C.B. i wsp.: Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat. Commun.* **7**, 11220 (2016)
48. Vanden Bergh P., Heller M., Braga-Lagache S., Frey J.: *The Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* exoproteome: global analysis, moonlighting proteins and putative antigens for vaccination against furunculosis. *Proteome Sci.* **11**, 44 (2013)
49. Yoshida N., Oeda K., Watanabe E., Mikami T., Fukita Y, Nishimura K., Komai K., Matsuda K.: Protein function. Chaperonin turned insect toxin. *Nature*, **411**, 44 (2001)

Wioletta Kmiecik<sup>1\*</sup>, Eligia Maria Szewczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wpłynęło w grudniu 2016 r.  
Zaakceptowano w lutym 2017 r.

1. Wstęp. 2. Koagulaza gronkowcowa. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Gronkowce grupy SIG. 4.1. *Staphylococcus intermedius*. 4.2. *Staphylococcus pseudintermedius*. 4.3. *Staphylococcus delphini*. 5. *Staphylococcus hyicus*. 6. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*. 7. *Staphylococcus lutrae*. 8. *Staphylococcus agnetis*. 9. Podsumowanie

#### Coagulase-positive species of the genus *Staphylococcus* – taxonomy, pathogenicity

**Abstract:** Staphylococci constitute an important component of the human microbiome. Most of them are coagulase-negative species, whose importance in the pathogenesis of human infections has been widely recognized and is being documented on a regular basis. Until recently, the only well-known coagulase-positive staphylococcus species recognized as human pathogen was *Staphylococcus aureus*. Previously, the ability to produce coagulase was used as its basic diagnostic feature, because other coagulase-positive species were associated with animal hosts. Progress in the laboratory medicine, in which automatic or semi-automatic systems identify the staphylococci species, revealed a phenomenon of spreading of the coagulase positive staphylococci to new niches and hosts, as they are being isolated from human clinical materials with increasing frequency. As a result, many researchers and laboratories have turned their attention to the phenomenon, which caused an inflow of new data on these species. An increasingly expansive pathogenic potential of coagulase-positive staphylococci against humans has been documented. In the presented study, recent data on both *S. aureus* and species previously considered to be animal, i.e. *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus* as well as newly described species *S. agnetis*, were shown.

1. Introduction. 2. Staphylococcal coagulase. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. *Staphylococcus intermedius* Group species. 4.1. *Staphylococcus intermedius*. 4.2. *Staphylococcus pseudintermedius*. 4.3. *Staphylococcus delphini*. 5. *Staphylococcus hyicus*. 6. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*. 7. *Staphylococcus lutrae*. 8. *Staphylococcus agnetis*. 9. Summary

**Słowa kluczowe:** gronkowce koagulazododatnie, grupa SIG, *Staphylococcus agnetis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*

**Key words:** coagulase-positive staphylococci, *Staphylococcus intermedius* group, *Staphylococcus agnetis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*

## 1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* zostały odkryte już w 1880 r. przez szkockiego lekarza Alexandra Ogstona, który nadał im nazwę wynikającą z zaobserwowanego obrazu mikroskopowego (gr. *staphyle* – winogrono, gr. *kókkos* – ziarno) [30]. Podział na gronkowce koagulazododatnie (Coagulase Positive Staphylococci, CPS) uważane za bardziej zjadliwe i koagulazoujemne (Coagulase Negative Staphylococci, CNS) w oparciu o zdolność do wykrzepiania osocza w próbie na koagulazę został zapoczątkowany w 1903 r. [59] i wciąż pozostaje dobrym kryterium różnicującym w obrębie tego rodzaju. Z czasem znaczenie diagnostyczne tej próby jako wyróżnika *S. aureus* znacząco straciło jednak na wartości także dlatego, że wykrywano są szczepy tego gatunku pozbawione tej cechy [93]. Ponadto w patologii człowieka pojawiły się nowe gatunki koagulazododatnie, pierwotnie uznawane za wyłącznie zwierzęce. Zjawisko przełamania barier międzygatunkowych,

pojawianie się nowych gatunków oraz zmiany taksonomii już odkrytych wymagają nowego spojrzenia na systematykę, diagnostykę i epidemiologię wywołanych przez nie zakażeń.

## 2. Koagulaza gronkowcowa

Koagulaza to enzym unikalny wśród bakterii. Z wyjątkiem niektórych gatunków gronkowców, stanowi czynnik zjadliwości produkowany przez nieliczne inne bakterie związane z człowiekiem. Wytwarzają ją też *Yersinia pestis*. Wykrywano także pojedyncze szczepy *Streptococcus faecalis*, *S. pyogenes*, *S. gordonii*, *Escherichia coli* czy *Serratia marcescens*, które były koagulazododatnie [6, 24, 63].

Koagulaza gronkowcowa występuje u bakterii tego rodzaju w dwóch postaciach – wolnej, uwalnianej do środowiska i związanej z komórką. Wytwarzanie obu białek regulowane jest przez loci *sar* i *agr* [65].

\* 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

Wyniki oznaczania koagulazy uwalnianej do środowiska stanowią jedno z podstawowych narzędzi diagnostycznych stosowanych w różnicowaniu gatunkowym gronkowców, gdyż stały się podstawą do podziału gronkowców na koagulazododatnie i – ujemne. Koagulaza wydzielana przez komórki konwertuje za pomocą domeny C-końcowej zawartą w osoczu protombinę lub inne, podobne strukturalnie substancje do trombinopodobnych produktów wykrzepiających w postaci widocznego skrzepu. Oznaczenie to wykonuje się metodą próbówką z użyciem rozcieńczonego osocza króliczego [60]. Jak wykazano w najnowszych badaniach, koagulaza wolna wraz z frakcją koagulazy związanej (ClfA) odgrywa aktywną rolę w produkcji biofilmu ClfA-zależnego. Wolna koagulaza pośredniczy w konwersji fibrynogenu do nierozpuszczalnej fibryny, która działa jako rusztowanie biofilmu, umożliwiając *S. aureus* gromadzenie się na powierzchniach powleczonych ludzkim osoczem. Działanie terapeutyczne kombinacji leków przeciwbakteryjnych oraz inhibitorów koagulazy lub plazminy przewyższa skuteczność leczenia z zastosowaniem samych antybiotyków. Udowodniono je w przypadku infekcji układu krążenia oraz stawów, we wczesnych stadiach zakażeń związanych z wszczepianiem urządzeń medycznych, a także w procesie zwalczania biofilmu tworzonego przez *S. aureus* [99].

Związana postać koagulazy gronkowcowej nazywana jest czynnikiem CF (clumping factor), a także czynnikiem skupiania i jest ściśle związana ze ścianą komórkową [23]. Forma ta oddziałuje wyłącznie na podatny fibrynogen, powodując jego wytrącanie w postaci precipitatu na powierzchni komórek gronkowców, zlepiając je. Właściwość ta wykorzystywana jest w metodzie szkiełkowej z zastosowaniem nierozcieńczonego osocza króliczego służącej do wykrywania czynnika CF w diagnostyce mikrobiologicznej. Czynniki te występują w dwóch postaciach (A i B), których produkcja jest zróżnicowana w zależności od szczepów [90].

Czynnik skupiania A (ClfA, clumping factor A) wytwarzany przez *S. aureus*, podobnie do białka A wiążącego fibrynogen FnBPA (fibrynogen-binding protein A), również występującego u tego gatunku, bierze pośrednio udział w aktywacji płytek krwi, co może mieć związek z patomechanizmem zakażeń układu krążenia (infekcje zastawek serca, bakteryjne zapalenie wsierdza), a także septycznego zapalenia stawów [42, 48]. Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na możliwość zastosowania ClfA w szczepionkach dla pacjentów z wysokim ryzykiem zachorowania na infekcyjne zapalenie wsierdza wywołane przez *S. aureus* [58].

Czynnik skupiania B (ClfB, clumping factor B) jest białkiem o wielkości 150 kDa, pośredniczącym w procesie zakotwiczenia MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) w ścianie komórkowej bakterii poprzez region C-termi-

nalny. N-końcowy region ClfB z kolei odgrywa pośrednią rolę w wiązaniu fibrynogenu, prowadząc do przylegania do niego bakterii, a w konsekwencji do tworzenia zakrzepów czy sprzyjając osiedlaniu na zastawkach serca. W swoich pracach Wertheim i wsp. wykazali, że ClfB ma wyraźne powinowactwo do cytokeratyny 10 ludzkiego typu I (CK10), która ulega ekspresji na łuskowatych komórkach nabłonkowych [96], co sprawia, że można uznać związek tego czynnika z kolonizacją w obrębie nosogardzieli człowieka.

U większości szczepów *S. aureus* obie postaci koagulazy (wolna i związana) występują w komórkach jednocześnie. U pozostałych gatunków koagulazododatnich, z wyjątkiem nielicznych szczepów *S. intermedius*, nie wykrywa się czynnika CF. Koagulazę związaną (czynnik CF) wytwarzają jednak zaliczane do gatunków koagulazoujemnych *Staphylococcus lugdunensis* i *Staphylococcus sciuri*. Gatunki te są izolowane od zwierząt i głównie u nich wywołują choroby. U ludzi *S. lugdunensis* stanowi element mikroflory skóry okolic pachwin i klatki piersiowej, ale także odpowiada za zapalenia wsierdza, stawów, zakażenia po wszczepieniach narządów czy protez, zapalenia płuc, a nawet zespół wstrząsu toksycznego [1]. Szczepy *S. sciuri* u ludzi kolonizują głównie obszar błony śluzowej przedsionka nosa, a także pachy i pochwę. Zakażenia wywoływane przez nie u człowieka są rzadkie, aczkolwiek mogą się rozprzestrzeniać w zamkniętych lub czasowo/częściowo izolowanych od społeczeństwa grupach ludzi, jak np. koszary [67]. Szczepy obu tych gatunków wykazują zdolność do wytwarzania wielu czynników chorobotwórczości typowych dla *S. aureus* takich jak lipazy, hemolizyny (słaba hemoliza na agarze z krwią baranią po 2 dniach inkubacji w przypadku *S. lugdunensis* [27]), enterotoksyny, toksyna eksfoliatywna C, a także omawiany tu czynnik CF. Mogły je zapewne nabyć na drodze horyzontalnego transferu genów.

### 3. *Staphylococcus aureus*

Nazwa gatunku *S. aureus* nadana w 1884 r. przez Rosenbacha pozostaje niezmienną mimo licznych reklasyfikacji w obrębie rodzaju. Sto lat później, na podstawie badań hiszpańsko-niemieckiego zespołu badawczego wykazano, iż w obrębie tego gatunku niektóre szczepy rosną tylko w warunkach beztlenowych, w związku z czym wyodrębniono dwa podgatunki: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* i *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* [54].

Zarówno w XIX wieku, jak i obecnie w identyfikacji fenotypowej *S. aureus* za najistotniejsze przyjmuje się następujące trzy cechy: barwę kolonii (pigment od białego, przez cytrynowy, kremowy do brązowego), zdolność do wytwarzania hemolizy typu  $\beta$  na pod-



łożu z dodatkiem krwi baraniej i wreszcie zdolność do wytwarzania koagulazy.

Gronkowiec złocisty *S. aureus* to wykazujący znaczny potencjał chorobotwórczy gatunek, często izolowany z materiałów klinicznych od ludzi. Jest przedmiotem ogromnej liczby prac badawczych, a także opracowań przeglądowych. Pierwszą, niezwykle szeroką pracą zbierającą wszystkie dotychczas opublikowane dane o *S. aureus* był dwuczęściowy artykuł Sheagrena opublikowany w 1984 r. [82, 83]. Spośród ogromu późniejszych prac na szczególną uwagę zasługują te autorstwa Knox i wsp. [53] z 2015 r. o transmisji szczepów tego gatunku w gospodarstwach domowych i środowisku oraz Alibayov i wsp. [2] z 2014 r., w której badacze podjęli trudny temat charakterystyki ruchomych elementów genetycznych *S. aureus*, co ma niezwykle istotne znaczenie w horyzontalnym transferze genów i zmienności nie tylko tego, ale i innych gatunków gronkowców. Wątek roli mobilnych elementów genetycznych w procesie nabywania genów kodujących czynniki wirulencji został szeroko opisany także w znaczącej pracy Helbin i wsp. [39] z 2012 r. Istotną z klinicznego punktu widzenia pracą zbierającą wiedzę na temat *S. aureus* jest artykuł Tong i wsp. [88] z 2015 r., który przedstawia dokładną analizę etiopatogenezy i klinicznej manifestacji określonych jednostek chorobowych (bakteriemia, infekcyjne zapalenie wsierdza, zakażenia skóry i tkanek miękkich, zakażenia układu kostno-stawowego) wywołanych przez gronkowce.

Zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe szczepów *S. aureus* przekłada się też na różnorodność cech prezentowanych przez pojedyncze szczepy. Istotne dla niniejszego opracowania jest zwrócenie uwagi na te cechy, które uważane wcześniej za typowe dla tego gatunku, odnajdujemy u innych koagulazododatnich gatunków, co może mieć szczególne znaczenie w przebiegu infekcji u ludzi. Koagulaza zaangażowana w proces wykrzepiania osocza obecna jest u wszystkich CPS [26]. Białko A, stanowiące istotny czynnik chorobotwórczości ze względu na swoje właściwości wiązania immunoglobulin przez fragment Fc, jest elementem ściany komórkowej gatunku *S. aureus*, ale może też być wytwarzane przez gatunki grupy SIG (*Staphylococcus intermedius* group) [15, 29].

Wiele CPS, podobnie jak *S. aureus*, jest wyposażone w liczne cytolizyny (hemolizyny –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  oraz leukotoksyny) [51]. Warto zaznaczyć, iż aktywność lityczna każdej z hemolizyn jest zróżnicowana zarówno pod względem wybiórczości działania (rodzaj erytrocytów), jak i mechanizmów ją warunkujących. Hemolizyna  $\alpha$  wywołuje lizę komórek docelowych (wysoka aktywność wobec erytrocytów króliczych, niska wobec ludzkich) wskutek tworzenia  $\beta$ -baryłkowych przezbłonowych porów, skutkując ucieczką jonów  $K^+$  i  $Ca^{2+}$ . Mechanizm działania hemolizyny  $\beta$  oparty jest na

destabilizacji struktury błony komórkowej erytrocytów baranich w wyniku hydrolizy sfingomieliny, co uwidocznić można w postaci efektu hot-cold (tzw. „podwójna hemoliza” – niekompletna hemoliza po wstępnej inkubacji w temperaturze 37°C, a następnie wzmocnienie hemolizy po inkubacji w 4°C). Hemolizyna  $\delta$  wyróżnia się dwoma mechanizmami działania w zależności od jej stężenia: poniżej stężenia granicznego agreguje do komórek docelowych, a następnie tworzy kanały zaburzające dwuwarstwową strukturę membrany komórkowej, zaś powyżej – działa jak surfaktant, niszcząc ją. Wykazuje ona aktywność cylicylną wobec erytrocytów różnych gatunków zwierząt. Z kolei dwukomponentowa  $\gamma$ -hemolizyna formuje  $\beta$ -cylindryczne pory, podobnie jak  $\alpha$ -toksyna, jednak wykazuje selektywność nie tylko wobec krwinek króliczych i ludzkich, ale także baranich [51].

Ze względu na licznie wytwarzane czynniki zjadliwości *S. aureus* jest organizmem modelowym, który posłużył badaniu złożonych mechanizmów kontroli i ekspresji chorobotwórczych białek [75] jak ClfB, glukozaminidaza, IsdA, IsaA, SACOL0688, nukleaza, lipaza, LytM, białko B wiążące fibronektynę. Jak wykazali Naidu i wsp. w swoich pionierskich badaniach, oprócz wiązania z fibronektyną, *S. aureus* wykazuje także zdolność do produkcji szeregu gronkowcowych białek wykazujących powinowactwo do białek gospodarza (m.in. do fibrynogenu, kolagenu, lamininy, transferryny, laktoferyny), co ma ogromne znaczenie w indukcji zakażeń [66].

Wśród najnowszych prac oryginalnych poświęconych *S. aureus* na pierwszy plan wysuwają się jednak te, które dotyczą problemu narastającej lekooporności, w tym występowania szczepów wieloopornych i ich rozprzestrzeniania. Wiele prac koncentruje się na procesie transmisji środowiskowej *S. aureus* stanowiącym jedno z największych zagrożeń socjoekonomicznych współczesnej medycyny zakażeń. Tosas Auguet i wsp. (2016) [89] w swojej pracy zwrócili uwagę na zakażenia wywoływane szczepami środowiskowymi *S. aureus* (community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA), które, jak się sądzi, z epidemiologicznego punktu widzenia mogą stać się większym zagrożeniem niż szczepy szpitalne (health-care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, HA-MRSA). Równie niepokojącym zjawiskiem jest odnotowywany wzrost przypadków zakażeń wywołanych szczepami *S. aureus* pochodzenia zwierzęcego (farm-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, FA-MRSA) [69]. Ponadto, stale poszukuje się skutecznych metod leczenia tych zakażeń oraz działań prewencyjnych im zapobiegających. Popov i wsp. [74] wskazują na rolę białka PLEKHA7 (Pleckstrin Homology Domain Containing A7) w ograniczaniu zjadliwości szczepów *S. aureus* wytwarzających

$\alpha$ -toksynę w przebiegu infekcji skórnych. Z kolei w pracy Wei i wsp. [95] udowodniono skuteczność przeniesienia pełnego mikrobiota przewodu pokarmowego od osób zdrowych jako alternatywnej metody leczenia zapalenia jelit wywołanego przez *S. aureus*.

Różnicowanie *S. aureus* od innych koagulazododatnich gatunków, a także tych gatunków między sobą

musi opierać się na szeregu cech. W przypadku rodzaju *Staphylococcus* większość gatunków koagulazoujemnych można odróżnić na podstawie cech fenotypowych. W przypadku gronkowców koagulazododatnich zadanie to nie jest łatwe, a wyniki tak jednoznaczne. Najważniejsze cechy stanowiące podstawę identyfikacji gatunków koagulazododatnich przedstawiono w Tabeli I.

Tabela I  
Wybrane cechy fenotypowe gronkowców koagulazododatnich [20, 26, 84, 92]

Cechy/czynnik	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	<i>S. inter-</i> <i>medius</i>	<i>S. pseudin-</i> <i>termedius</i>	<i>S. del-</i> <i>phini</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	<i>S. lutrae</i>	<i>S. agnetis</i>
Aerobioza	-	+	+	+	+	+	+	+	ND
Katalaza	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Wielkość kolonii > 5 mm	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Pigment	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Koagulaza wolna	+	+	+	+	+	D(-)	+	+	-/+**
Czynnik CF	+	-	D	-	-	-	-	-	-
DNaza	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Termostabilna nukleaza	+	+	+	+	+	D(+)	+	ND	ND
Hemoliza	+	+	+	+	+	-	+	+	-
$\beta$ -hemolizyna	D	+	+	+	ND	-	ND	+	ND
Acetoina (Voges-Proskauer)	+	-	W	+	-	-	+	-	-
Ureaza	W	ND	+	+	+	D	+	+	-
Reduktaza azotanowa	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Fosfataza alkaliczna	+	+	+	+/-	+	+	+	+	-
Hialuronidaza	+	+	ND	+	ND	+	-	-	ND
Oksydaza	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
Dihydrolaza argininy	W	ND	D	+	+	+	+	-	+
$\beta$ -galaktozydaza	-	-	D	+	ND	-	ND	-	-
$\beta$ -glukozydaza	+	-	D	+	ND	D	ND	+	ND
$\beta$ -glukuronidaza	-	-	-	-	ND	D	ND	-	D
Arylamidaza pirolidonylu	-	-	+	+	ND	-	D	ND	-
Produkcja kwasów:									
- galaktoza	+	-	-	+	ND	+	+	+	D(+)
- D-glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- D-fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	D(+)	+
- D-mannoza	+	-	+	+	+	+	+	+	+
- mannitol	+	-	D	W, D	+	-	+/-	+	-
- arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	D	-
- laktoza	+	-	D	+	+	+	D(+)	+	+
- maltoza	+	+	-/W	+	+	-	-	+	-
- sacharoza	+	+	+	+	+	+	D(-)	+	+
- D-trehaloza	+	-	+	+	-	D(+)	-	+	+/-
- D-ksyloza	-	-	-	-	-	-	-	W	-
- D-turanoza	W	ND	D	W, D	ND	-	ND	-	-
- ksylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- salicyna	-	-	-	-	ND	-	ND	D	-
- celobioza	-	-	-	-	ND	-	-	+	-
- melezytoza	-	-	-	-	ND	-	-	-	-

Tabela I – c.d

Cechy/czynnik	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	<i>S. inter-</i> <i>medius</i>	<i>S. pseudin-</i> <i>termedius</i>	<i>S. del-</i> <i>phini</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	<i>S. lutrae</i>	<i>S. agnetis</i>
– D-rafinoza	–	–	–	–	ND	–	–	+	–
– D-fukoza	–	ND	–	–	ND	–	ND	D	–
– L-fukoza	–	ND	–	–	ND	–	ND	D	–
Oporność na antybiotyki:									
Wrażliwość na nowobiocynę	+	+	–	+	+	+	+	–	+
Wrażliwość na akryflawinę	–	ND	+	+	+	+	+	+	ND
Wrażliwość na polimyksynę B	–	ND	+	+	+	–	+	+	–
Wrażliwość na deferoksaminy	–	–	ND	–	ND	ND	ND	+	–
Wrażliwość na lizostafinę	+	+	ND	+	+	+	ND	–	+
Wrażliwość na lizozym	–	–	ND	+	–	–	ND	ND	–
Wrażliwość na fosfomicynę	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND

Legenda:

D – zależnie od szczepu, D(+) – zazwyczaj pozytywnie, D(–) – zazwyczaj negatywnie, ND – nie zbadane, W – reakcja słaba

\* – szczepy *S. lutrae* i *S. intermedius* izolowane od gołębi i norek nie wykazują zdolności do silnej produkcji DNazy;

szczepy *S. intermedius* izolowane od psów, koni i innych gatunków wykazują silną reakcję dodatnią w próbie zdolności do wytwarzania DNazy

\*\* – po 4 h inkubacji koagulazoujemne, po 24 h 20–25% szczepów jest koagulazododatnie

#### 4. Gronkowce grupy SIG

Trzy gatunki: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* i *S. delphini* stanowią taksonomicznie wydzieloną grupę określaną jako SIG (*Staphylococcus intermedius* group). Jako pierwszy został odkryty gatunek *Staphylococcus intermedius*. Czeski naukowiec Hájek opisał go w 1976 r. na podstawie swoich badań nad szczepami zwierzęcymi [36]. Nazwa gatunkowa (łac. *inter* – pomiędzy, łac. *medius* – środek) odnosi się do właściwości biochemicznych, które łączą cechy dwóch innych gatunków – *S. aureus* i *S. epidermidis* [9]. Znacznie później, bo dopiero w roku 2005 belgijski zespół naukowy, wśród szczepów pierwotnie zidentyfikowanych jako *S. intermedius*, wyodrębnił nowy gatunek *Staphylococcus pseudintermedius* (gr. *pseudos* – fałszywy). Uznano go za odrębną jednostkę taksonomiczną, której szczepy wykazują jednak znaczne fenotypowe i genotypowe podobieństwo do *S. intermedius* [19]. Odkrycie to poddaje w wątpliwość dane dotyczące gatunku *S. intermedius* opisywane w pracach przed rokiem 2005. Filogenetyczne podobieństwo wiąże oba te gatunki z odkrytym w 1988 r. *S. delphini*. Wynikające z bliskiego pokrewieństwa i nieznacznego zróżnicowania biochemicznego trudności w diagnostyce były podstawą utworzenia grupy SIG [78]. W wielu pracach powstałych po jej wydzieleniu nie jest jednak precyzowane czy wyniki dotyczą szczepów *S. intermedius* dokładnie zidentyfikowanych do gatunku czy kwalifikujących się do grupy, co stało się przyczyną, dla której ustalenie podawanych w piśmiennictwie informacji na temat szczepów nazywanych *S. intermedius* bywa trudne [94]. W Tabeli II

przedstawiono materiały kliniczne, z jakich izolowane były *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* od ludzi oraz metody, jakie wykorzystano do ich identyfikacji.

Techniką umożliwiającą prawidłową identyfikację gatunków CPS, w szczególności należących do grupy SIG, jest metoda opracowana przez Sasaki i wsp. [79] oparta na różnicach w sekwencji genu termonukleazy *nuc* między poszczególnymi gatunkami. Ostatnio zaproponowano także różnicowanie *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* z zastosowaniem specyficznych gatunkowo starterów dla genu *hly* [52]. Spośród innych technik molekularnych wykorzystywanych w celu różnicowania gatunków SIG, stosowana jest także metoda sekwencjonowania genów 16S rRNA, ale ze względu na ich znaczne podobieństwo przekraczające 99%, metoda ta nie jest przydatna do ich identyfikacji [50].

##### 4.1. *Staphylococcus intermedius*

Naturalnym miejscem bytowania bakterii z gatunku *S. intermedius* są skóra i błony śluzowe zwierząt. Opublikowano liczne prace dotyczące izolacji szczepów tego gatunku od psów, ale także gołębi, norek, kotów, koni, szopów, kóz, szarych wiewiórek czy tygrysa syberyjskiego [41, 46], jednakże część tych informacji pochodzi sprzed 2005 r., co może nieść ze sobą ryzyko wcześniejszej niewłaściwej identyfikacji.

Szczepy gatunku *S. intermedius* są czynnikami etiologicznymi różnego rodzaju zakażeń występujących zarówno u zwierząt, jak i coraz częściej u ludzi. W oparciu o prace opublikowane w latach 2010–2016 uznaje się, że u człowieka *S. intermedius* stanowi czynnik

Tabela II  
Metody identyfikacji izolowanych od ludzi szczepów *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* z przypadków od roku 2005  
[4, 16, 18, 21, 22, 38, 46, 47, 56, 70, 76, 80, 84]

Gatunek	Rodzaj zakażenia	Materiał	Metoda identyfikacji	Rok publikacji
<i>Staphylococcus intermedius</i>	infekcyjne zapalenie wsierdzia	wymaz z rany, płyn stawowy	system Vitek II	2010 [18]
	bakteriemia	krew, płyny stawowe	próby biochemiczne	2012 [38]
	ropień mózgu	materiał ropny	system BBL Crystal	2005 [4]
	zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	płyn mózgowo-rdzeniowy	próby biochemiczne, sekwencjonowanie	2010 [22]
	– (prawdopodobieństwo zatruc pokarmowych)	mleko	próby biochemiczne	2012 [21]
	– (prawdopodobieństwo zatruc pokarmowych)	mięso (kielbasa)	próby biochemiczne	2006 [67]
	ropnie skóry	materiał ropny	testy API, sekwencjonowanie	2010 [45]
	zapalenie zatok	materiał z jamy nosowo-gardłowej, płwocina	metoda genetyczna	2009 [46]
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	bakteriemia odcewnikowa	krew	system PMIC/ID-30 i Vitek II, sekwencjonowanie	2010 [16]
	zapalenie zatok przynosowych	aspirat z zatok	system ID 32 STAPH, MLST typing, <i>spa</i> typing, PFGE i <i>SCCmec</i> typing	2010 [82]
	infekcyjne zapalenie wsierdzia	materiał z ran pooperacyjnych	system Vitek2-GP, MALDI-TOF	2011 [73]
	zapalenie płuc	BAL	system ID 32 STAPH, Vitek2	2012 [55]
	infekcje ran pooperacyjnych	materiał z ran pooperacyjnych	system Vitek2	2013 [77]

etiologiczny głównie infekcji skóry, a także układu moczowego, kości i ośrodkowego układu nerwowego [41]. Szczepy zidentyfikowane jako *S. intermedius* izolowano również z przypadków infekcyjnego zapalenia wsierdzia [18], bakteriemii, zapalenia zatok przynosowych [38], ropnia mózgu [4] i zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [22]. Dodatkowo uznaje się możliwość wywoływania zatruc pokarmowych w związku z jego izolacją z próbek produktów spożywczych, np. mleka i mięsa [21, 70]. Opisane zostały także przypadki zapalenia płuc [32] oraz zapalenia jamy sutkowej [49]. Identyfikacja szczepów opisywanych w tych badaniach była prowadzona wyłącznie metodami konwencjonalnymi, opartymi na fenotypie. Biorąc pod uwagę fakt, iż jedynie metoda Sasaki i wsp. [79] może zapewnić prawidłową identyfikację szczepów grupy SIG, żaden spośród wyżej wymienionych przypadków nie spełnił niniejszego kryterium.

Szczepy *S. intermedius* mogą wytwarzać liczne czynniki chorobotwórczości: koagulazę, enterotoksynę A, enterotoksynę C i jej wariant SEC<sub>canine</sub> specyficzny dla izolatów z piodermii psów [7], białko A [29], termonukleazę [78] oraz cytolizyny, takie jak leukotoksyna Luk-I [68] czy hemolizyny. Wśród tych ostatnich β-hemolizyna wytwarzana jest często i zwykle konstitutywnie, rzadko wytwarzana jest δ-hemolizyna, zaś α-hemolizyna tylko w pojedynczych przypadkach [29].

Zjawisko lekooporności wśród szczepów *S. intermedius* jest dość powszechne, bowiem nawet do 95%

z nich wykazuje oporność na antybiotyki β-laktamowe. Dotyczy to zwłaszcza zwierzęcych izolatów pochodzących od psów i gołębi. Szczególnie w przypadku zwierząt mających bliski kontakt z człowiekiem zjawisko to stanowi źródło dodatkowego ryzyka [28].

#### 4.2. *Staphylococcus pseudintermedius*

Gatunek *Staphylococcus pseudintermedius*, podobnie jak *S. intermedius*, kolonizuje skórę i błony śluzowe różnych gatunków zwierząt, głównie psów i kotów, u których może wywoływać infekcje skóry i uszu [44]. Coraz częściej drobnoustrój ten jest źródłem zakażeń również u ludzi i jest najczęściej izolowanym gatunkiem grupy SIG. Do grup ryzyka zakażeniami wywołowanymi przez *S. pseudintermedius* zalicza się pacjentów z obniżoną odpornością oraz osoby pozostające w bliskim kontakcie ze zwierzętami, czyli właściciele zwierząt domowych i personel weterynaryjny [10]. Ryzyko transmisji *S. pseudintermedius* na ludzi w przypadku tej ostatniej grupy ma ścisły związek z szeroko rozpowszechnionym występowaniem tego gatunku w weterynaryjnym środowisku szpitalnym [97]. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na wzrost liczby tych infekcji jest zjawisko nosicielstwa *S. pseudintermedius* występujące w obu grupach ryzyka [73]. Dotychczas opisanymi przypadkami infekcji u ludzi wywołanymi przez ten patogen są bakteriemie [16], zapalenie zatok przynosowych [84], infekcyjne zapalenie wsierdzia

[76], zapalenie płuc [56] oraz infekcje ran pooperacyjnych [80]. Część z tych doniesień dotyczy jednak szczepów zidentyfikowanych wyłącznie w oparciu o metody klasyczne, bez molekularnego potwierdzenia. W niektórych przypadkach identyfikacja została potwierdzona metodami molekularnymi, innymi niż Sasaki i wsp. (np. sekwencjonowanie), które nie są jednak rekomendowane do różnicowania gatunków grupy SIG. Wśród najważniejszych przykładów zakażeń wywołanych tymi bakteriami z potwierdzeniem molekularnym szczepów wyróżnia się przypadek zakażenia rany transplantacji szpiku kostnego wywołanego szczepem *S. pseudintermedius* u człowieka ze śmiertelnym finałem dla pacjenta [80] oraz pierwszy w Polsce przypadek infekcji tym gatunkiem u psa [64].

Potencjał chorobotwórczy *S. pseudintermedius* jest uwarunkowany przez liczne czynniki wirulencji, m.in. koagulazę, białko A, proteazę, enterotoksyny, toksynę eksfoliatywną SIET oraz podobnie do *S. intermedius* cytolizyny, tj. leukotoksynę Luk-I i hemolizyny ( $\beta$ -hemolizyna produkowana w sposób konstytutywny, zaś  $\delta$ - i  $\alpha$ -toksyna rzadko) [15, 33].

Dodatkowym zagrożeniem jest wzrost liczby szczepów lekoopornych odnotowywany na przestrzeni ostatnich lat. Najczęściej dotyczy on szczepów MRSP (methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*) oraz MDRSP (multi-drug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*) [43], w tym szczepów opornych na fluorochinolony [44] czy mupirocynę [62].

### 4.3. *Staphylococcus delphini*

W 1988 r. włoscy naukowcy Varaldo i wsp. wyizolowali ze zmian ropnych na skórze delfinów nowy gatunek gronkowców wytwarzających koagulazę. Ze względu na pochodzenie izolatów otrzymał on nazwę *Staphylococcus delphini* [91]. W jego obrębie wyróżnia się dwie fenotypowo i genotypowo odrębne grupy szczepów (A i B). Wskazuje się, że szczepy grupy B *S. delphini* mogą nawet stanowić oddzielny gatunek [78].

Bakterie te izolowano później także od nerek, fretek i borsuków [34, 85]. Odnotowano również przypadki ich izolacji od koni, wielbłądów, krów, gołębi, osłów i lisów [34, 98]. Stanowiły one u nich naturalne mikrobiota. Patogenność wskazano jedynie w trzech doniesieniach opisujących zapalenie wymion u krów oraz biegunki u nerek [5, 31]. Nie ma, jak dotąd, doniesień o izolacji tego gatunku od ludzi.

Szczepy *S. delphini* mają zdolność do koagulacji osocza króliczego, świńskiego, bydłowego oraz ludzkiego [91]. Savini i wsp. [81] jako pierwsi wykazali zdolność *S. delphini* do wytwarzania  $\beta$ -hemolizyny, nie wiadomo jednak czy jej produkcja ma charakter konstytutywny, jak ma to miejsce w przypadku pozostałych gatunków SIG. Wśród innych czynników wirulencji tego gatunku

wymienić można leukocydynę Panton-Valentine, eksfoliatynę oraz enterotoksyny A i E [31, 33].

Szczepy *S. delphini* są w większości wrażliwe na antybiotyki powszechnie stosowane w leczeniu infekcji gronkowcowych [85]. Opisano jednak przypadek izolatu tego gatunku opornego na kwas fusydowy [33].

### 5. *Staphylococcus hyicus*

Gatunek ten został odkryty już w 1950 r. przez izraelskiego mikrobiologa Davida Sompolinsky'ego jako *Micrococcus hyicus*. Materiał do badań stanowiły izolaty pobrane od świń z wysiękowym zapaleniem skóry. Wskutek późniejszych modyfikacji taksonomii gronkowców i mikrokoków gatunek ten został ostatecznie zaklasyfikowany do rodzaju *Staphylococcus* [20].

Bakterie z gatunku *Staphylococcus hyicus* są oficjalnie zaliczane do grupy CPS, jednakże w rzeczywistości jest to gatunek koagulazozmienny, gdyż część jego izolatów może być koagulazoujemna. Szczepy tego gatunku wchodzi w skład mikrobiota różnych gatunków zwierząt, przede wszystkim świń oraz drobiu. Są odpowiedzialne za choroby takie jak wysiękowe zapalenie skóry, ropne zapalenie stawów i martwica uszu u świń, zapalenie wymion u krów oraz zapalenie mieszków włosowych u drobiu [14, 20, 71]. Znane są jedynie dwa przypadki odzwierzęcych infekcji u ludzi wywołanych przez *S. hyicus* – zakażenie rany wskutek ugryzienia przez osła oraz bakteriemia u hodowcy trzody chlewnej [13]. Ostatnio przypisuje się temu gatunkowi udział w patogenezie zatruc pokarmowych u ludzi [35].

Szczepy *S. hyicus* mają zdolność do produkcji toksyny eksfoliatywnej ExhA, koagulazy, lipazy oraz białka wiążącego IgG. W 2015 r. Calcutt i wsp. w swoich badaniach dotyczących analizy sekwencji genomu *S. hyicus* wykazali, że gatunek ten filogenetycznie jest najbardziej spokrewniony z dwoma gronkowcami: koagulazoujemnym *Staphylococcus chromogenes* oraz nowo odkrytym koagulazozmiennym *Staphylococcus agnetis* [12, 13, 71].

Problem lekooporności, podobnie jak pozostałych CPS, dotyczy także szczepów *S. hyicus* [72]. W badaniach Park i wsp. oporność na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe u szczepów *S. hyicus* jest szeroko rozpowszechniona: aż 97% szczepów jest opornych na penicylinę G i ampicylinę, a 71% na wykorzystywaną w weterynarii cefalosporynę – ceftiofur [71].

### 6. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*

Gatunek *Staphylococcus schleiferi* został opisany w 1988 r. przez francuski zespół naukowy Freney i wsp. na podstawie badań nad szczepami wyizolowanymi od ludzi. Otrzymał epitet gatunkowy „schleiferi” na cześć

niemieckiego mikrobiologa Karla Heinza Schleifera [27]. Początkowo opisywany był jako gatunek koagulazoujemny. W 1990 r., w wyniku badań szczepów izolowanych od psów przez japońskich badaczy Igimi i wsp. wyodrębniono dwa podgatunki – koagulazoujemny *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* oraz koagulazododatni *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* [40]. Szczepy pierwszego z nich wykazują zdolność wytwarzania pseudokoagulazy, której aktywność jest hamowana przez inhibitory proteaz i antykoagulanty. Podgatunek *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* może wykrzepiać osocze pomimo ich obecności. Cecha ta stała się podstawą ich różnicowania w obrębie gatunku [87].

*Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* może być błędnie identyfikowany jako jeden z gatunków SIG bądź *S. aureus* [100]. Izolowany jest głównie od psów, u których może wywoływać ropne zapalenie skóry [37] czy ucha zewnętrznego [45]. Szczepy tego podgatunku mogą rzadko wywoływać również infekcje u ludzi. Opisano zakażenie rany pooperacyjnej palca, zapalenie wsierdza po transplantacji wątroby, zakażenie po operacji kardiochirurgicznej. Zagrożenie to dotyczy szczególnie osób mających stały kontakt ze zwierzętami [87]. Ponadto odnotowano przypadki izolacji tych gronkowców z mięsa [61].

Bakterie z podgatunku *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* wytwarzają termostabilną nukleazę oraz  $\beta$ -hemolizynę (efekt hot-cold na podłożu krwawym z dodatkiem krwi baraniej), w związku z czym mogą wykazywać zdolność do synergistycznej hemolizy [8, 40]. Niepokojącym zjawiskiem jest wzrost liczby szczepów tego podgatunku opornych na różne antybiotyki, w tym  $\beta$ -laktamowe [45].

## 7. *Staphylococcus lutrae*

Spośród wszystkich CPS *Staphylococcus lutrae* jest najrzadszym i stosunkowo najmniej poznany gatunkiem. Po raz pierwszy opisał go brytyjski zespół badawczy Foster i wsp. w 1997 r. i na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA zaproponował utworzenie nowej jednostki taksonomicznej [17, 25]. Gatunek ten został wyizolowany z materiału pobranego *post mortem* od wydr europejskich (*Lutra lutra*), skąd wywodzi się jego nazwa. Wykazuje właściwości hemolityczne na podłożu krwawym z dodatkiem krwi baraniej, jednak wciąż nie wiadomo nic więcej na temat wytwarzanych przez *S. lutrae* hemolizyn. Gatunek charakteryzuje się wrażliwością na nowobiocynę, deferoksaminy i fosfomicynę. Według analizy filogenetycznej przeprowadzonej przez Foster i wsp. *S. lutrae* wykazuje najbliższe pokrewieństwo z gronkowcami z gatunków *S. delphini*, *S. felis*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* i *S. muscae*.

Dotychczas opisano tylko jeden przypadek izolacji szczepu tego gatunku z mleka kozy z zapaleniem gruczołu mlekowego. Szczep wykazał wrażliwość na cefaleksynę, kotrimoksazol, gentamycynę, neomycynę, oksacylinę oraz tetracyklinę [77].

## 8. *Staphylococcus agnetis*

Gatunkiem ostatnio zaklasyfikowanym do grupy CPS jest *Staphylococcus agnetis*, nazwany tak na cześć pierwszej w Europie kobiety chirurga weterynaryjnego, Finki Agnes Sjöberg. W 2012 r. fińsko-belgijscy naukowcy wyizolowali go z próbek mleka pobranego od krów z zapaleniem wymion [86]. W oparciu o wyniki analizy filogenetycznej stwierdzono bliskie pokrewieństwo *S. agnetis* z koagulazododatnim *S. hyicus* oraz koagulazoujemnym *S. chromogenes*. Ze względu na znaczne fenotypowe i genetyczne podobieństwo tych gatunków istnieje ryzyko wcześniejszych błędnych identyfikacji [55]. W 2015 r. Al-Rubaye i wsp. [3] przeprowadzili analizę genomu jednego ze szczepów *S. agnetis* wyizolowanych od drobiu z zapaleniem szpiku kostnego i chondronekrozą. Ich badania wykazały, że gatunek ten posiada ortologię wielu czynników wirulencji, takich jak białka wiążące fibronektynę, toksyna eksfoliatywna A, homologi superantygenopodobne czy  $\beta$ -hemolizyna. Jednocześnie potwierdzone zostało filogenetyczne pokrewieństwo tego gatunku z *S. hyicus* i *S. chromogenes*.

Podobnie jak *S. hyicus*, *S. agnetis* jest gatunkiem koagulazozmiennym. Wytwarza m.in. koagulazę (tylko część szczepów po przedłużonej inkubacji) i DNAzę, nie wykazuje natomiast aktywności hemolitycznej [86]. Calcutt i wsp. w 2014 r. w swoich badaniach nad genomem *S. agnetis* znaleźli w jego sekwencjach otwarte ramki odczytu (open reading frame, ORF) mogące świadczyć o obecności genów  $\beta$ -hemolizyny czy hialuronidazy [11].

Bakterie z tego gatunku są wrażliwe na nowobiocynę i lizostafinę, a odporne na lizozym, polimiksynę i deferoksaminy [86]. W 2015 r. León-Galván i wsp. wykazali oporność izolowanych przez siebie szczepów *S. agnetis* na penicylinę, ampicylinę, cefotaksym i klindamycynę oraz ich wrażliwość na bakteriocyny produkowane przez *Bacillus thuringiensis* (morricyna 269, kurstacyna 287, kenjacyna 404, entomocyna 420, tolwortcyna 524) [57].

## 9. Podsumowanie

Gronkowce koagulazododatnie są niezbyt liczną pod względem liczby gatunków, ale dość zróżnicowaną grupą. Na przestrzeni ostatniej dekady wiedza

na ich temat uległa znacznym modyfikacjom nie tylko pod względem zmian taksonomicznych, ale również w zakresie chorobotwórczości i lekowrażliwości. Do niedawna gronkowce koagulazododatnie inne niż *S. aureus* postrzegane były głównie jako rzadkie drobnoustroje typowo zwierzęce i środowiskowe. Zważywszy jednak na ekspansywny charakter infekcji przez nie wywoływanych oraz rosnący odsetek pacjentów z predyspozycjami do zakażeń oportunistycznych powodowanych tymi gatunkami (np. niedobory odporności, wiek podeszły, przewlekłe choroby towarzyszące, szerokowidmowa antybiotykoterapia), mogą się one stać w niedalekiej przyszłości znaczącymi patogenami ludzkimi. Koagulaza gronkowcowa, uznawana pierwotnie za czynnik różnicujący gatunki rodzaju *Staphylococcus*, może mieć bezpośredni związek z patomechanizmem chorób indukowanych przez gatunki koagulazododatnie.

## Piśmiennictwo

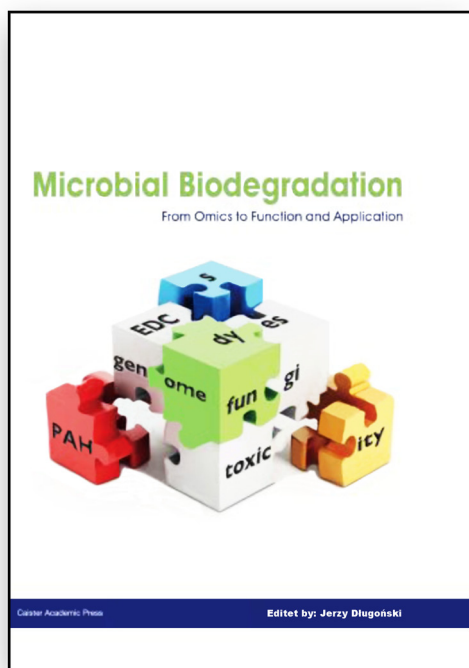
- Aguilar L., Cafini F., Puente P., Alou L., Sa P.: Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 287–291 (2005)
- Alibayov B., Baba-Moussa L., Sina H., Zdeňková K., Demnerová K.: *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 5005–5018 (2014)
- Al-Rubaye A.A.K., Couger M.B., Ojha S., Pummill J.F., Koon II J.A., Wideman Jr. R.F., Rhoads D.D.: Genome analysis of *Staphylococcus agnetis*, an agent of lameness in broiler chickens. *PLoS One*, **10**, 1–18 (2015)
- Atalay B., Ergin F., Cekinmez M., Caner H., Altinors N.: Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius*. *Acta Neurochir. (Wien)*, **147**, 347–348 (2005)
- Bannoehr J., Ben Zakour N.L., Waller A.S., Guardabassi L., Thoday K.L., Van Den Broek A.H.M., Fitzgerald J.R.: Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: Insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J. Bacteriol.* **189**, 8685–8692 (2007)
- Bayliss B.G., Hall E.R.: Plasma coagulation by organisms other than *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **89**, 101–105 (1965)
- 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)
- Bemis D.A., Bryant M.J., Reed P.P., Brahmabhatt R.A., Kania S.A.: Synergistic hemolysis between  $\beta$ -lysin-producing *Staphylococcus* species and *Rothia nasimurium* in primary cultures of clinical specimens obtained from dogs. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **26**, 437–441 (2014)
- 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)
- 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)
- Calcutt M.J., Foecking M.F., Fry P.R., Hsieh H.-Y., Perry J., Stewart G.C., Scholl D.T., Messier S., Middleton J.R.: Draft genome sequence of bovine mastitis isolate *Staphylococcus agnetis* CBMRN 20813338. *Genome Announc.* **2**, 1–2 (2014)
- Calcutt M.J., Foecking M.F., Hsieh H., Adkins P.R.F., Stewart G.C., Middleton J.R.: Sequence analysis of *Staphylococcus hyicus* ATCC 11249 T, an etiological agent of exudative epidermitis in swine, reveals a type VII secretion system locus and a novel 116-kilobase genomic island harboring toxin-encoding genes. *Genome Announc.* **3**, 14–15 (2015)
- Casanova C., Iselin L., Von Steiger N., Droz S., Sendi P.: *Staphylococcus hyicus* bacteremia in a farmer. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 4377–4378 (2011)
- Chenier S., Lallier L.: Acantholytic folliculitis and epidermitis associated with *Staphylococcus hyicus* in a line of white leghorn laying chickens. *Vet. Pathol.* **49**, 284–287 (2012)
- 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. (Praha)*. **56**, 415–422 (2011)
- 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)
- Da Costa G.M., Paiva L.V., Piccoli R.H., Figueiredo D.J., Pereira U.D.P., Da Silva N.: Evaluation of a simplified key for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *Acta Sci. Biol. Sci.* **32**, 403–406 (2010)
- 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)
- Devriese L.A., Hajek V., Oeding P., Meyer S.A., Schleifer K.H.: *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. chromogenes subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 482–490 (1978)
- Devriese L.A., Vancanneyt M., Baele M., Vaneechoutte M., De Graef E., Snauwaert C., et al.: *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1569–1573 (2005)
- 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)
- Durdik P., Fedor M., Jesenak M., Hamzikova J., Knotkova H., Banovcin P.: *Staphylococcus intermedius* – rare pathogen of acute meningitis. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e236–238 (2010)
- Duthie B.Y.E.S.: Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. *J. Gen. Microbiol.* **10**, 427–436 (1954)
- Feodorova V.A., Devdariani Z.L.: Development, characterisation and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* fibrinolysin and coagulase. *J. Med. Microbiol.* **49**, 261–269 (2000)
- Foster G., Ross H.M., Hutson R.A., Collins M.D.: *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 724–726 (1997)
- Foster T.J.: Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet. Dermatol.* **20**, 456–470 (2009)
- Freney J., Brun Y., Bes M., Meugnier H., Grimont F., Grimont P.A.D., Nervi C., Fleurette J.: *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 168–172 (1988)
- Futagawa-Saito K., Ba-Thein W., Fukuyasu T.: High occurrence of multi-antimicrobial resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from healthy and diseased dogs and domesticated pigeons. *Res. Vet. Sci.* **83**, 336–339 (2007)

29. 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**, 1–5 (2006)
30. Galloway D. B.: The Aberdeen Medico-Chirurgical Society 1789 to the present day: Some leaders in medicine. *J. Pediatr. Surg.* **46**, 284–288 (2011)
31. Gary J.M., Langohr I.M., Lim A., Bolin S., Bolin C., Moore I., Kiupel M.: Enteric colonization by *Staphylococcus delphini* in four ferret kits with diarrhoea. *J. Comp. Pathol.* **151**, 314–317 (2014)
32. Gerstadt 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., 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.* **47**, 463–466 (2014)
34. Guardabassi L., Schmidt K.R., Petersen T.S., Espinosa-Gongora C., Moodley A., Agersø Y., Olsen J.E.: *Mustelidae* are natural hosts of *Staphylococcus delphini* group A. *Vet. Microbiol.* **159**, 351–353 (2012)
35. Guimaraes F.D.F., Nobrega D.B., Richini-Pereira V.B., Marson P.M., Pantoja J.C.D.F., Langoni H.: Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.* **96**, 2866–2872 (2013)
36. Hajek V.: *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 401–408 (1976)
37. Hariharan H., Gibson K., Peterson R., Frankie M., Matthew V., Daniels J., Martin N.A., Andrews L., Paterson T., Sharma R.N.: *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* from canine pyoderma cases in Grenada, West Indies, and their susceptibility to beta-lactam drugs. *Vet. Med. Int.* **2014**, 1–7 (2014)
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. Helbin W.M., Polakowska K., Międzobrodzki J.: Czynniki wirulencji *Staphylococcus aureus* zależne od bakteriofagów. *Postep. Mikrobiol.* **54**, 291–298 (2012)
40. Igimi S., Takahashi E., Mitsuoka A.N.D.T.: *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 409–411 (1990)
41. Jee H., Pakhrin B., Bae I.-H., Shin N.-S., Lee S.-I., Yoo H.-S., Kim D.Y.: Pyelonephritis associated with *Staphylococcus intermedius* in a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *J. Vet. Med. Sci.* **69**, 851–852 (2007)
42. Josefsson E., Higgins J., Foster T. J., Tarkowski A.: Fibrinogen binding sites P 336 and Y 338 of clumping factor A are crucial for *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS One.* **3**, 1–7 (2008)
43. Kang M., Chae M., Yoon J., Kim S., Lee S., Yoo J., Park H.M.: Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *J. Vet. Sci.* **15**, 409–415 (2014)
44. Kang M., Chae M., Yoon J., Lee S., Yoo J., Park H.M.: Resistance to fluoroquinolones and methicillin in ophthalmic isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from companion animals. *Vet. Rec.* **55**, 678–682 (2014)
45. Kawakami T., Shibata S., Murayama N., Nagata M., Nishifuji K., Iwasaki T., Fukata T.: Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **72**, 1615–1619 (2010)
46. Kelesidis T., Tsiodras S.: *Staphylococcus intermedius* is not only a zoonotic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e838–841 (2010)
47. Kempker R., Mangalat D., Kongphet-Tran T., Eaton M.: Beware of the Pet Dog: A case of *Staphylococcus intermedius* infection. *Am. J. Med. Sci.* **338**, 425–427 (2009)
48. Kerrigan S.W., Clarke N., Loughman A., Meade G., Foster T.J., Cox D.: Molecular basis for *Staphylococcus aureus* – mediated platelet aggregate formation under arterial shear *in vitro*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 335–341 (2008)
49. 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)
50. Kizerwetter-Świda M., Chrobak-Chmiel D., Rzewuska M., Binek M.: *Staphylococcus pseudintermedius* – trudno rozpoznawalny patogen. *Postep. Mikrobiol.* **54**, 103–114 (2015)
51. Kmiecik W., Szewczyk E.M.: Cytolizyny – czynniki zjadliwości *Staphylococcus intermedius* i *Staphylococcus pseudintermedius*. *Postep. Mikrobiol.* **54**, 354–363 (2015)
52. Kmiecik W., Szewczyk E.M., Ciszewski M.: Searching for beta-haemolysin *hly* gene in *Staphylococcus pseudintermedius* with species-specific primers. *Curr. Microbiol.* **73**, 148–152 (2016)
53. Knox J., Uhlemann A.-C., Lowy F.D.: *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. *Trends Microbiol.* **23**, 437–444 (2015)
54. De La Fuente R., Suarez G., Schleifer K.H.: *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the casual agent of abscess disease of sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 99–102 (1985)
55. Lange C.C., Brito M.A., Reis D.R., Machado M.A., Guimaraes A.S., Azevedo A.L., Salles É.B., Alvim M.C., Silva F.S., Meurer I.R.: Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Vet. Microbiol.* **176**, 382–388 (2015)
56. Laurens C., Marouze N., Jean-Pierre H.: [*Staphylococcus pseudintermedius* and *Pasteurella dagmatis* associated in a case of community-acquired pneumonia]. *Médecine Mal. Infect.* **42**, 129–131 (2012)
57. León-Galván M.F., Barboza-Corona J.E., Lechuga-Arana A., Valencia-Posadas M., Aguayo D.D., Cedillo-Pelaez C., Martínez-Ortega E.A., Gutierrez-Chavez A.J.: Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of Central Mexico. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–9 (2015)
58. Li X., Wang X., Thompson C.D., Park S., Park B., Lee C.: Pre-clinical efficacy of clumping factor A in prevention of *Staphylococcus aureus* infection. *MBio.* **7**, 1–13 (2016)
59. Loeb L.: The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *J. Med. Res.* **10**, 407–419 (1903)
60. Malachowa N., Kobayashi S.D., Porter A.R., Braughton K.R., Scott P., Gardner D.J., Missiakas D.M., Schneewind O., DeLeo F.R.: Contribution of *Staphylococcus aureus* coagulases and clumping factor A to abscess formation in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *PLoS One*, **11**, 1–14 (2016)
61. Martins P.D., de Almeida T.T., Basso A.P., de Moura T.M., Frazzon J., Tondo E.C., Frazzon A.P.: Coagulase-positive staphylococci isolated from chicken meat: pathogenic potential and vancomycin resistance. *Foodborne Pathog. Dis.* **10**, 771–776 (2013)
62. Matanovic K., Pérez-Roth E., Pintaric S., Martinec B.Š.: Molecular characterization of high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1005–1007 (2013)



63. Meier P.S., Entenza J.M., Vaudaux P., Francioli P., Glauser M.P.: Study of *Staphylococcus aureus* pathogenic genes by transfer and expression in the less virulent organism *Streptococcus gordonii*. *Infect. Immun.* **69**, 657–664 (2001)
64. Międzobrodzki J., Kasprowicz A., Białecka A., Jaworska O., Polakowska K., Władyka B., Dubin A.: The First Case of a *Staphylococcus pseudintermedius* Infection after Joint Prosthesis Implantation in a Dog. *Polish J. Microbiol.* **59**, 133–135 (2010)
65. Moreillon P., Entenza M., Francioli P., McDevitt D., Foster T.J., Franc P., Vaudaux P.: Role of *Staphylococcus aureus* Coagulase and Clumping Factor in Pathogenesis of Experimental Endocarditis. *Infect. Immun.* **63**, 4738–4743 (1995)
66. Naidu A.S., Międzobrodzki J., Musser J.M., Rosdahl V.T., Hedstroms S.-A., Forsgren A.: Human lactoferrin binding in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **34**, 323–328 (1991)
67. Nemeghaire S., Argudin M.A., Feßler A.T., Hauschild T., Schwarz S., Butaye P.: The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes. *Vet. Microbiol.* **171**, 342–356 (2014)
68. Nishiyama A., Antonette M., Guerra R.V., Sugawara N., Yokota K., Kaneko J., Kamio Y.: Identification of serine138 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)
69. Nowakowicz-Dębek B., Wlazło Ł., Kasela M., Ossowski M.: Epidemiologia wielolekoopornych szczepów *Staphylococcus aureus*. *Probl. Hig. i Epidemiol.* **97**, 106–112 (2016)
70. 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)
71. Park J., Friendship R.M., Poljak Z., Weese J.S., Dewey C.E.: An investigation of exudative dermatitis (greasy pig disease) and antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus aureus* isolated from clinical cases. *Can. Vet. J.* **54**, 139–144 (2013)
72. Park J., Friendship R.M., Weese J.S., Poljak Z., Dewey C.E.: An investigation of resistance to  $\beta$ -lactam antimicrobials among staphylococci isolated from pigs with exudative dermatitis. *BMC Vet. Res.* **9**, 1–8 (2013)
73. 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)
74. Popov L.M., Marceau C.D., Starkl P.M., Lumb J.H., Shah J., Guerrero D.: The adherens junctions control susceptibility to *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 14337–14342 (2015)
75. Den Reijer P.M., Haisma E.M., Toom N.A.L., Willemse J.: Detection of alpha-toxin and other virulence factors in biofilms of *Staphylococcus aureus* on polystyrene and a human epidermal model. *PLoS One*, **11**, 1–19 (2016)
76. 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)
77. Salina A., Machado G.P., de Guimarães F., Langoni H.: Microbial sensibility of *Staphylococcus* spp. isolated of goat milk with subclinical mastitis. *Veterinária E Zootec.* **22**, 288–294 (2015)
78. 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)
79. Sasaki T., Tsubakishita S., Tanaka Y., Sakusabe A., Ohtsuka M., Hirota S., Kawakami T., Fukata T., Hiramatsu K.: Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 765–769 (2010)
80. Savini V., Carretto E. i wsp.: Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a bone marrow transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1636–1638 (2013)
81. Savini V., Kosecka M., Marrollo R., Carretto E., Międzobrodzki J.: CAMP test detected *Staphylococcus delphini* ATCC 49172 beta-haemolysin production. *Pol. J. Microbiol.* **62**, 465–466 (2013)
82. Sheagren J.N.: *Staphylococcus aureus*. The persistent pathogen (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* **310**, 1368–1373 (1984)
83. Sheagren J.N.: *Staphylococcus aureus*. The persistent pathogen (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* **310**, 1437–1442 (1984)
84. 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)
85. Stull J.W., Slavic D., Rousseau J., Weese J.S.: *Staphylococcus delphini* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in horses. *Canada, Emerg. Infect. Dis.* **20**, 3–5 (2014)
86. Taponen S., Supré K., Piessens V., van Coillie E., de Vlieghe S., Koort J.M.K.: *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulasevariable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 61–65 (2012)
87. Thibodeau E., Boucher H., DeNofrio D., Pham D.T., Snyderman D.: First report of a left ventricular assist device infection caused by *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans*: a coagulase positive organism. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **74**, 68–69 (2014)
88. Tong S.Y.C., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G.: *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 603–661 (2015)
89. Tosas Auguet O., Kypraios T. i wsp.: Evidence for community transmission of community-associated but not health-care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains linked to social and material deprivation: spatial analysis of cross-sectional data. *PLoS One*, **13**, 1–24 (2016)
90. Tsompanidou E., Denham E.L., Sibbald M.J.J.B., Yang X., Seinen J., Friedrich A.W., Buist G., van Dijk J.M.: The sortase A substrates FnbpA, FnbpB, ClfA and ClfB antagonize colony spreading of *Staphylococcus aureus*. *Thromb. Haemost.* **7**, 1–7 (2012)
91. Valardo P.E., Kilpper-Balz R., Biavasco F., Satta G., Schleifer K.H.: *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 436–439 (1988)
92. 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
93. Wang L., Wang D. i wsp.: A coagulase-negative and non-haemolytic strain of *Staphylococcus aureus* for investigating the roles of SrtA in a murine model of bloodstream infection. *Pathog. Dis.* **73**, 1–8 (2015)
94. Wang N., Neilan A. M., Klompas M.: *Staphylococcus intermedius* infections: case report and literature review. *Infect. Dis. Rep.* **5**, 6–11 (2013)
95. Wei Y., Gong J., Zhu W., Guo D., Gu L., Li N., Li J.: Fecal microbiota transplantation restores dysbiosis in patients with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* enterocolitis. *BMC Infect. Dis.* **15**, 1–8 (2015)

96. Wertheim H., Walsh E., Choudhury R., Melles D., Boelens H., Miajlovic H., Verbrugh H.A., Foster T., van Belkum A.: Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. *PLoS Med.* **5**, e1–17 (2008)
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)
98. Zakour B.N.L., Beatson S.A., van den Broek A.H.M., Thoday K.L., Fitzgerald J.R.: Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1–15 (2012)
99. Zapotoczna M., McCarthy H., Rudkin J.K., Gara J.P.O., Neill E.O.: An essential role for coagulase in *Staphylococcus aureus* biofilm development reveals new therapeutic possibilities for device-related infections. *J. Infect. Dis.* **212**, 1883–1893 (2015)
100. Zdrovc I., Ocepek M., Pirš T., Krt B., Pinter L.: Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase-positive staphylococci. *J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal.* **51**, 449–454 (2004)



**Tytuł:** **Microbial Biodegradation. From Omics to Function and Application.**  
**Autor:** praca zbiorowa w języku angielskim pod redakcją naukową Jerzego Długońskiego  
**Wydawnictwo:** Caister Academic Press,  
**Projektant okładki:** Andrzej Długoński i Jerzy Długoński  
 Norfolk, UK 2016  
 ISBN 978-1-910190-45-6 (paperback)  
 ISBN 978-1-910190-46-3 (ebook)

Z prawdziwą przyjemnością informuję, iż oficyna brytyjska Caister Academic Press wydała w 2016 roku podręcznik akademicki pod redakcją prof. Jerzego Długońskiego z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego. Już sam tytuł wskazuje na to, że podręcznik ten będzie skupiony na najnowszych osiągnięciach z dziedziny ochrony środowiska w zakresie biodegradacji substancji szkodliwych w świetle dynamicznie rozwijających się dziedzin molekularnych zawierających w nazwie końcówkę „omika” t.j. genomika, proteomika, lipidomika czy metabolomika. Podręcznik został napisany przez wyśmienitych Autorów o składzie międzynarodowym. Kolejne więc rozdziały zostały opracowane przez specjalistów w danej dziedzinie, reprezentujących znane ośrodki akademickie i naukowe, wykazujących duże doświadczenie oraz dorobek naukowy w zakresie opisywanych zagadnień. Sekwencja przedstawianych problemów w ramach kolejnych rozdziałów jest logiczna i zaczyna się artykułem autor-

stwa Sylwii Różalskiej i Roksany Iwanickiej-Nowickiej o możliwościach degradacji zanieczyszczeń organicznych na bazie rozwiązań z zakresu genomiki, metagenomiki i metatranskryptomiki. Kolejny, bardzo dobry artykuł o znaczeniu metali ciężkich i możliwościach usuwania skutków ich obecności w środowisku autorstwa Panów Łukasz Dziewita i Łukasza Drewniaka nie pozostawia wątpliwości o wysokim poziomie naukowym podręcznika. Następne artykuły dotyczą: molekularnych markerów w procesach biodegradacji (Aleksandra Ziemińska-Buczyńska), metabolomiki i proteomiki (Rafał Szewczyk i Konrad Kowalski) oraz lipidomiki (Przemysław Bernat) jako kluczowych rozwiązań w zakresie mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń środowiskowych. Jerzy Długoński oraz Anna Jasińska i Aleksandra Góralczyk opisują następnie procesy mikrobiologicznego rozkładu zanieczyszczeń pochodnych hormonalnych i barwników organicznych. Rozdział o wykorzystaniu metod bioinformatycznych i rozkładzie policyklicznych węglowodorów aromatycznych przygotował zespół naukowców z National Center for Toxicological Research Food and Drug Administration z Jefferson, AR, USA. Kolejny zespół międzynarodowy ocenił możliwości rozkładu mikrobiologicznego związków lotnych, a zespół z udziałem Mirosławy Słabej oraz Katarzyny Hrynkiewicz opisał mechanizmy usuwania metali ciężkich przez drobnoustroje. Nie zabrakło również wiedzy na temat rozkładu biosurfaktantów (Katarzyna Paraszkiwicz) oraz aplikacyjnego znaczenia nauk z członem „omika” w nazwie w tym zakresie. Tak więc do oceny przedstawiono nowoczesny podręcznik o najnowszych osiągnięciach naukowych z zakresu biodegradacji związków szkodliwych zalegających w środowisku naturalnym. Wydanie podręcznika w angielskim systemie wydawniczym świadczy na pewno o jego wysokiej wartości naukowej i walorach wydawniczych. Należy podkreślić, iż szata graficzna podręcznika jest bez zarzutu, a Autorzy precyzyjnie i jasno opisują trudne zagadnienia biodegradacji związane zarówno z ochroną środowiska jak i obecnych w nim udziałem nauk o podłożu molekularnym. Podręcznik zawiera też szereg schematów, wykresów i tabel, które w przystępny i pomysłowy sposób stanowią uzupełnienie wiedzy. Każdy rozdział jest zakończony spisem aktualnej literatury, która pochodzi z ostatnich lat. Tak więc do rąk studentów, a także osób zainteresowanych z różnych powodów procesami biodegradacji przy udziale drobnoustrojów trafia cykl dobrze i nowocześnie opracowanych, typowych akademickich wykładów. Taka forma prezentacji trudnej dziedziny wiedzy, do której z pewnością należy biodegradacja jest godna polecenia wszystkim zainteresowanym. To wszystko sprawia, że mamy do czynienia z bardzo potrzebnym i nowoczesnym podręcznikiem opisującym możliwości biodegradacji substancji szkodliwych w środowisku. Należy wyrazić uznanie dla Zespołu Autorów za podjęcie się tego przedsięwzięcia, jakim jest zbiór wykładów i przegląd procesów biodegradacyjnych. Podręcznik z pełnym przekonaniem można zalecić zarówno akademikom jak i studentom kierunków ochrony środowiska i biotechnologii prowadzonych zarówno w Uniwersytetach jak i Uczelniach Technicznych i Przyrodniczych.

*Prof. dr hab. Jacek Bielecki*



**W dniu 27.03.2017 r. odbyło się pierwsze zebranie  
Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów kadencji 2016–2020.**

Poniżej w punktach, w formie skrótowej przedstawiono omawiane sprawy i komentarz.

1. Prezes PTM – prof. S. Tyski powitał zebranych – przybyli wszyscy członkowie ZG PTM z wyjątkiem: wiceprezes prof. E. Augustynowicz-Kopeć, Przewodniczącej Oddz. Bydgoszcz, dr Alicji Sękowskiej – w zastępstwie obecna była wiceprzewodnicząca dr Agnieszka Mikucka, ponadto obecne były 4 zaproszone osoby. Łącznie do głosowania uprawnionych było 23 osoby ZG PTM.

Po przyjęciu programu zebrania nastąpiła prezentacja wszystkich uczestników spotkania.

2. Prezes PTM przedstawił informację o działalności Prezydium PTM od Zjazdu w Bydgoszczy Poinformował o 3 listach do członków Prezydium PTM oraz 3 listach informacyjnych do członków ZG PTM. Omówił sprawę przekazania materiałów PTM z dotychczasowej siedziby PTM w Bydgoszczy do nowej siedziby w Warszawie. Zwrócił uwagę, na fakt nie przedstawienia do dnia Zebrania rozliczenia finansowego PTM za rok 2016, jak również bilansu za Zjazd PTM w Bydgoszczy, co stawia obecny Zarząd PTM w trudnej sytuacji.

Omówiono sprawę organizacji biura PTM w nowej siedzibie na terenie Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, dokonania zmian w Krajowym Rejestrze Sądowym oraz w dostępie do kont bankowych PTM w BGZ BNP PARIBAS. Poinformowano o zatrudnieniu Pań sekretarki i księgowej do prowadzenia spraw PTM.

3. Pani mgr Karolina Stępień poinformowała o utworzeniu konta PTM na portalu społecznościowym Facebook oraz o utworzeniu nowej strony internetowej PTM.
4. Prezes PTM poinformował o zawartości nowej strony internetowej PTM, która jeszcze jest w trakcie uzupełniania.

Prosimy osoby zainteresowane pewnymi obszarami mikrobiologii o włączenie się w działalność sekcji PTM (bakteriologia kliniczna, wirusologia kliniczna, mykologia kliniczna, mikrobiologia farmaceutyczna, żywności, przemysłowa, środowiskowa, diagnostyka laboratoryjna), które chcielibyśmy uruchomić (**Struktura > Sekcje**). Od szeregu lat pojawiały się postulaty o stworzenia takiego forum. Prosimy o zwrócenie uwagi na konferencje krajowe i zagraniczne oraz szkolenia (**Konferencje i szkolenia**). Na stronie

internetowej chcemy umieszczać wszystkie informacje dotyczące powyższej działalności, zwłaszcza o krajowych konferencjach organizowanych i współorganizowanych przez Oddziały Terenowe PTM oraz planowanych pod patronatem PTM, a także innych konferencjach mikrobiologicznych niezwiązanych z PTM. Dział (**Współpraca > Współpraca zagraniczna**) zawiera podstawowe informacje o dużych mikrobiologicznych organizacjach światowych, natomiast w części (**Nagrody i stypendia**) sygnalizujemy możliwości stypendialne FEMS i informacje o innych wyróżnieniach, które mogą otrzymać członkowie PTM.

Wskazane jest, aby każdy Oddział Terenowy PTM zamieścił informacje o swojej historii, dokonaniach, działalności, planach, konferencjach itp. (**Oddziały Terenowe**). Bardzo zależy nam na nowych członkach zwyczajnych, ale również członkach wspierających PTM, przede wszystkim organizacjach i firmach działających w obszarze mikrobiologii (**Członkowie i składki > Członkowie wspierający**). Dużą uwagę przywiązujemy do historii mikrobiologii, zwłaszcza historii PTM i wkładu Polaków w mikrobiologię światową i krajową (**Historia**). W części (**Praca**) zamierzamy zamieszczać oferty staży lub możliwości pracy dla mikrobiologów, jak również ogłoszenia o poszukiwaniu pracy przez mikrobiologów, przekazane do PTM.

Tworzone są nowe strony internetowe czasopism PTM z bezpośrednim dostępem do strony PTM, co ma ułatwić informację o publikacjach i zwiększyć ich cytowalność (**Wydawnictwa PTM**).

**Bardzo prosimy o nadsyłanie uwag, co do zawartości i wyglądu nowej strony PTM, a także podawanie informacji dodatkowych, które uważacie Państwo, że powinny dotrzeć do szerokiego grremium członków naszego Towarzystwa. ([ptm.zmf@wum.edu.pl](mailto:ptm.zmf@wum.edu.pl)).**

Strona będzie poprawiana i aktualizowana na bieżąco, tak, aby stać się możliwie dobrą, atrakcyjną wizytówką Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

5. Prezes PTM przedstawił sytuację finansową PTM, którą trzeba szybko i zdecydowanie poprawić. Na dzień 24.03.2017 r. na koncie bieżącym PTM znajdowało się 6.677 zł, na koncie pomocniczym 7.193 zł,

na lokacie 207.000 zł. Roczny koszt wydawania czasopism PTM wynosi około: Postępy Mikrobiologii – 63.000 zł, Polish Journal of Microbiology – 73.000 zł (koszt wydawania kwartalnika Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia pokrywa Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny). Inne istotne koszty działalności PTM w 2017 r. to: biuro PTM – ok. 25.000, utworzenie i administracja stron internetowych PTM i czasopism ok. 10.000 zł, składka do FEMS 5.620 zł (1,4 Euro od każdego z 900 członków PTM, w 2016 r. składka dotyczyła 1 130 osób). Podsumowując, obecnie wydatki około 3-krotnie przewyższają przychody PTM.

6. Nieznana jest rzeczywista liczba członków PTM. Kilkaset osób od szeregu lat nie płaci składek rocznych na rzecz PTM. Osoby te same nie zrezygnowały z członkostwa w naszym Towarzystwie ani nie zostały z niego wykluczone przez ZG PTM. Wiele z tych osób nie pamięta o wstąpieniu w przeszłości do PTM, inne nadal podają, że należą do PTM pomimo niepłacenia składek członkowskich. ZG PTM nie dysponuje adresami wielu takich członków. Sytuacja ta musi zostać rozwiązana na Nadzwyczajnym Walnym Zgromadzeniu Delegatów PTM na Konferencji 90 lat PTM.

Analizując wyciągi bankowe na dzień 20.03.2017 r., składkę PTM za 2015 r. zapłaciły 646 osoby, za 2016 – 674 osoby i za 2017 r. 179 osoby. Średnia wysokość składki rocznej PTM to 100 zł.

List Sekretarza PTM w tej sprawie wraz z listą członków PTM w Oddziale został w dniu 4.02.2017 r. skierowany do Przewodniczących Oddziałów. Przypomniano w nim Statut PTM:

§ 14 ust 3. „Członek zwyczajny jest zobowiązany do regularnego opłacania składki członkowskiej w wysokości ustalonej przez Walne Zgromadzenie Delegatów Towarzystwa”.

§ 15 ust 3. „Członkostwo zwyczajne ustaje na skutek skreślenia z listy członków Towarzystwa z powodu niezapłacenia składki członkowskiej przez dwa kolejne lata...”

**W związku z porządkowaniem listy członków zwyczajnych PTM, osoby, które nie zapłaciły składki za lata 2015, 2016 uprzejmie są proszone o uregulowanie tych składek. Osoby, które nie opłaciły składek za lata 2014, 2013 i wcześniejsze, proszone są o uregulowanie tych składek (można to uczynić w miesięcznych ratach w ciągu I półrocza 2017 r.), a w przypadku nieuregulowania składek do 30.06.2017 r. osoby te mogą zostać skreślone z listy członków zwyczajnych PTM.**

Szeregu osobom zależy na utrzymaniu ciągłości przynależności do PTM i opłacają składki za kilka lat wstecz, większość jednak nie ma ochoty na wyrównanie kilkuset złotych zaległości. W przypadku, gdy

disponujemy aktualnym adresem, osoby te zostaną wcześniej powiadomione przez Oddział Terenowy PTM, o możliwości skreślenia ich z listy członków PTM w sytuacji nieuregulowania zaległych składek PTM do dnia 30.06.2017 r. Sprawa usunięcia osób od szeregu lat nie płacących składek będzie omawiana w trakcie Walnego Zgromadzenia Delegatów PTM na Konferencji w Krakowie.

Staramy się znaleźć sposoby na zwiększenie przychodów PTM poprzez poszukiwanie członków wspierających PTM, sponsorów konferencji, wynajmowanie powierzchni wystawowych na konferencjach – wysłano ponad 80 listów i e-maili w tej sprawie do firm działających w obszarze mikrobiologii. Jak na razie brak jest szerszego zainteresowania. Poszukuje się również osób mogących przystąpić do PTM jako członkowie zwyczajni.

Pani księgowa PTM została poproszona o uzyskanie opinii w sprawie możliwości zmniejszenia opłat VAT (z 23% do 5%) od ceny za wydrukowanie artykułów w czasopismach wydawanych przez PTM (Postępy Mikrobiologii i Polish Journal of Microbiology) oraz w sprawie płacenia VAT 23% od składek członkowskich PTM.

7. Ukazał się numer 1/2017 Postępów Mikrobiologii, w którym zamieszczono krótkie informacje biograficzne o członkach ZG PTM i Komisji Rewizyjnej PTM, a także informacje o działalności PTM i konferencjach współorganizowanych przez PTM oraz pod patronatem PTM. Informacje o działalności PTM będą zamieszczane we wszystkich zeszytach 3 czasopism PTM.
8. Poinformowano o 3 zebraniach Prezydium PTM, które odbyły się: 23.11.2016, 25.01.2017, 15.02. 2017. Na pierwsze przybyli wszyscy członkowie Prezydium, dwa pozostałe odbyły się w trybie korespondencyjnym – e-mailowym.
9. Przedstawiono przyjęte w tym okresie przez Prezydium PTM Uchwały – nr 11–24 z 2016 r. i nr 1–10 2017 r. oraz 3 Postanowienia z 2016 r. Jednomyślnie przyjęto, na zebraniu ZG PTM, Uchwałę o akceptacji wszystkich podjętych przez Prezydium PTM Uchwał i Postanowień.
10. Przedstawiono projekty dyplomów, które zostaną wręczone nowym Członkom Honorowym PTM podczas Konferencji 90 lat PTM.
11. Sekretarz PTM przedstawiła listę ponad 50 kandydatów na członków zwyczajnych PTM, którzy w ostatnim czasie wyrazili gotowość przystąpienia do PTM. Jednomyślnie podjęto Uchwałę w sprawie przyjęcia wszystkich kandydatów do PTM. Członkami Towarzystwa osoby te zostaną po wniesieniu składki członkowskiej PTM za rok 2017.
12. Sekretarz PTM przedstawiła również kandydata na członka wspierającego PTM. Jest to ważny moment

- dla PTM – pierwsza, szerzej nie znana firma zobowiązała się wspierać finansowo nasze Towarzystwo. Miejmy nadzieję, że dołączą również znane, duże firmy, od lat działające na rynku produktów związanych z mikrobiologią. Jednymyślnie podjęto Uchwałę w sprawie przyjęcia firmy **HCS Europe-Hygiene & Cleaning Solutions** do PTM jako Złotego Członka Wspierającego
13. Przewodniczący Zarządów Oddziałów Terenowych PTM przedstawili informacje z działalności swoich Oddziałów w ub. r. i okresie do 27.03.2017 r. oraz o planach na przyszłość, a także realizacji prób Prezydium PTM dotyczących informacji o osobach nie płacących składek i poszukiwaniu nowych członków PTM.
  14. Poniesiono sprawę przekazywania pewnych funduszy przez ZG PTM Oddziałom Terenowym na prowadzoną przez nich działalność Towarzystwa. Jednakże ze względu na złą obecnie sytuację finansową wsparcie Oddziałów w proponowanej formie jest niemożliwe. W przyszłości można rozważyć pomysł, że część środków przekazanych przez darczyńcę lub członka wspierającego zachęconego do popierania PTM przez dany Oddział Terenowy, będzie udostępniana na jego działalność w ramach PTM.
  15. Przekazano informacje o odbytych konferencjach pod patronatem PTM:
    - „International Forum on Tuberculosis in Central and Eastern Europe” (listopad 2016 r.) współorganizowanej przez Oddział Warszawski PTM;
    - II Konferencja „Stare i nowe patogeny – aktualne problemy” (luty 2017 r.), współorganizowanej przez Oddział Lubelski PTM.
  16. Prezes PTM, delegat PTM do IUMS i FEMS, przedstawił informacje o konferencjach organizowanych przez obie Federacje oraz o stypendiach FEMS. Na grudniowy konkurs stypendialny „FEMS Research Grant” – zgłosiła się jedna osoba i uzyskała finansowanie wyjazdu naukowego przez FEMS. W związku ze zmianami w statucie FEMS, powstała potrzeba przeprowadzenia wyborów kandydata PTM do Komitetu Wyborczego FEMS „Election Committee – ElCom”, który ma się zajmować doбором kandydatów na stanowiska funkcyjne we władzach FEMS i nadzorem nad przebiegiem konkursów. Wiceprzewodniczący PTM prof. Jacek Miedzobrodzki zgłosił kandydaturę Prezesa PTM prof. Stefana Tyskiego do Komitetu Wyborczego FEMS, innych kandydatów nie zgłoszono. Przeprowadzono głosowanie tajne, kandydat uzyskał 22 głosów, jeden głos był nieważny, tym samym Prezes PTM został kandydatem PTM do ElCom FEMS.
  17. Redaktorzy Naczelni czasopism PTM przedstawili sytuację w swoich redakcjach i wydawanych czasopismach:
    - Postępy Mikrobiologii – prof. Jacek Bielecki,
    - Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia – prof. Waldemar Rastawicki
    - Polish Journal of Microbiology – prof. Izabela Sitkiewicz
 Redaktor Naczelna Polish Journal of Microbiology poinformowała o zamiarze rezygnacji z pełnionej funkcji. Rozpoczynamy, zatem poszukiwania odpowiedniej osoby, która mogłaby przejąć obowiązki Redaktora Naczelnego tego kwartalnika.
  18. Zastanawiano się nad redukcją kosztów wydawania i dystrybucji czasopism PM i PJM w wersji papierowej (co stanowi główny koszt działalności PTM), w tym znacznym zmniejszeniem liczby drukowanych zeszytów i odejściem od prenumeraty – przesyłania pocztą zeszytów czasopism do członków PTM (roczny koszt samych znaczków pocztowych wynosi około 22.000 zł). Poruszano sprawy rozbudowy zeszytów czasopism w wersji internetowej, opracowywanie angielskojęzycznej, internetowej wersji Postępów Mikrobiologii. Uzgodniono, że artykuły w kwartalnikach Postępy Mikrobiologii i Polish Journal of Microbiology będą drukowane, dopiero po wystawieniu przez biuro PTM faktur dla autorów korespondencyjnych i po zapłaceniu przez nich kosztów wydania artykułu.
  19. Zaplanowano następne spotkanie Prezydium PTM z Redaktorami Naczelnymi i Sekretarzami czasopism oraz Kierownikiem Zakładu Wydawniczego, na maj 2017 r. Wtedy Redaktorzy powinni przedstawić propozycje możliwości znacznego obniżenia kosztów wydawania czasopism, podniesienia cytalności artykułów oraz zwiększenia liczby publikowanych manuskryptów poprzez uruchomienie możliwości publikacji jedynie w wersji internetowej.
  20. Poruszono sprawę umieszczania reklam w kwartalnikach Postępy Mikrobiologii i Polish Journal of Microbiology. Przyjęto uchwałę (w tym 3 głosy wstrzymujące się) znacznie zwiększającą opłaty za umieszczanie reklam. Poprzednie opłaty skalkulowane były w oparciu o koszty druku, bez korzyści dla PTM. Omawiano również sprawę wydawania suplementów kwartalnika Postępy Mikrobiologii zawierających materiały konferencyjne. Jednymyślnie przyjęto uchwałę, że koszt druku suplementów i ich dystrybucji dla uczestników konferencji ponosi organizator konferencji. Suplementy drukowane będą tylko w liczbie egzemplarzy opłaconych przez organizatora konferencji. Natomiast suplementy te będą dostępne dla wszystkich zainteresowanych w internetowej wersji Postępów Mikrobiologii.
  21. Pan prof. Jacek Miedzobrodzki poinformował o organizacji konferencji naukowej „90 lat PTM wczoraj – dziś – jutro”. Istotne informacje znajdują się w Komunikacie II w części materiałów

- dotyczących konferencji PTM. Ustalono, że na Konferencję każdy Oddział przygotowuje plakat dotyczący działalności Oddziału.
22. Pojawiła się komplikacja związana z pozyskiwaniem sponsorów. Izba Producentów i Dystrybutorów Diagnostyki Laboratoryjnej Związek Pracodawców, zrzeszona w MedTech Europe ([www.medtecheurope.org](http://www.medtecheurope.org)) zobowiązała się do stosowania Kodeksu Etycznych Praktyk Biznesowych. Wiąże się to z zaprzestaniem bezpośredniego sponsorowania organizacji i osób związanych z ochroną zdrowia. W związku z tym, że do PTM należą osoby pracujące w ochronie zdrowia oraz w ramach Uniwersytetu Jagiellońskiego działają Wydział Lekarski i szpitale kliniczne, powyższa Izba i należąca do niej firma BioMerieux, poinformowały, że nie mogą sponsorować PTM i naszej Konferencji 90 lat PTM organizowanej w Krakowie 2017 r. Jest to duża strata, tym bardziej, że Dyrektor firmy BioMerieux poinformował, że nie może również ufundować nagrody dla wyróżniającego się młodego naukowca, członka PTM, tak jak miało to miejsce w latach 2008 i 2012. Spróbujemy jednak skorzystać z pewnych sygnalizowanych możliwości wsparcia.
23. Omawiano formę udziału PTM w konferencjach organizowanych lub pod patronatem PTM. Jednymyślnie podjęto uchwałę, że na stronie PTM i w czasopiśmie PTM umieszczone będą informacje o konferencjach oraz udostępnione zostanie logo PTM organizatorom takich konferencji. Ze względów finansowych nie mogą być przekazywane kwoty wspierające konferencje. Natomiast w przypadku organizowania na konferencji konkursu np. na najlepszą prezentację lub plakat, możliwe będzie wyróżnienie laureata publikacją artykułu w kwartalnikach Postępy Mikrobiologii lub Polish Journal of Microbiology bez opłaty redakcyjnej. Osoba wyróżniona musi należeć do PTM, a artykuł musi przejść klasyczny proces redakcyjny i uzyskać pozytywne recenzje.
24. Przyjęto Uchwały o objęciu patronatem konferencji:
- \* IX Ogólnopolskiej Konferencji Hydromikrobiologicznej – HYDROMICRO 2017: DROBNOUSTROJE – OSIĄGNIĘCIA I WYZWANIA organizowanej przez Katedrę Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, w terminie 17–19 września 2017 r. w Olsztynie (Podjęto uchwałę, w tym jedna osoba głosowała przeciw).
  - \* Juvenes Pro Medicina 2017 – 55 Konferencja Ogólnopolska i 13 Konferencja Międzynarodowa
- Studenckiego Towarzystwa Naukowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, w terminie 19–20 maja 2017 r. w Łodzi (Podjęto uchwałę, w tym jedna osoba wstrzymała się od głosu).
- \* II Ogólnopolskiego Sympozjum Mikrobiologicznego „METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK” organizowanego przez Instytut Agrofizyki PAN, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa PIB oraz SGGW w terminie 29–30 czerwca 2017 w Lublinie (Uchwałę podjęto jednymyślnie).
25. Dyskutowano nad sprawą pracy dla mikrobiologów – diagnostów laboratoryjnych. Na spotkaniu Prezydium ZG PTM w dniu 23.11.2016 omawiano kwestię dostępu absolwentów uniwersyteckich studiów magisterskich, kierunku Mikrobiologia, którzy uzyskali tytuł magistra mikrobiologii do zawodu Diagnosty Laboratoryjnego oraz analizowano stanowisko 5 polskich uniwersytetów prowadzących takie studia. Dokumenty w tej sprawie wpłynęły do PTM od Pani prof. Rudnickiej z Uniwersytetu Łódzkiego. Stanowisko PTM nie zostało wtedy wypracowane, zmiana przepisów na korzystne dla mikrobiologów wymaga nowelizacji prawa. Aktualną wolą polityczną jest, aby Diagnostami Laboratoryjnymi (DL) były osoby z wykształceniem medycznym, które ukończyły jednolite, 5 letnie studia, co ma swoje uzasadnienie. Taki DL może pracować w różnych laboratoriach – o profilu chemicznym, serologicznym, czy też mikrobiologicznym. Tytuł mgr mikrobiologii predysponuje w zasadzie do pracy tylko w diagnostyce mikrobiologicznej bez możliwości podpisywania wyników jako DL. Kilkanaście lat temu, gdy kierunek Analityki Medycznej na uczelniach medycznych nie był powszechny, a potrzebowano DL, umożliwiono, po studiach podyplomowych mgr biologii o różnych specjalnościach pracę jako DL. Trzeba sobie zdawać sprawę, że ten okres przejściowy jednak skończył się i obecnie, co roku pojawia się duża liczba absolwentów kierunków medycznych, którzy uzyskują uprawnienia DL i dla których trzeba znaleźć pracę. Pojawia się pytanie – co możemy lub raczej powinniśmy zrobić jako PTM?
- Obecnie ustalono, że Panie: prof. Beata Sadowiska, dr Joanna Jursa-Kulesza i dr Elżbieta Stefaniuk przygotowują robocze stanowisko PTM, które zostanie przekazane do dyskusji i akceptacji przez ZG PTM. Stanowisko to zostanie rozpowszechnione na stronie i w czasopiśmie PTM.

SEKRETARZ  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów  
*A. Laudy*  
dr n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów  
*Stefan Tyski*  
prof. dr hab. Stefan Tyski



**INFORMACJA O KONFERENCJACH WSPÓLORGANIZOWANYCH  
PRZEZ POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW  
ORAZ Z PATRONATEM PTM W 2017 R.**



**Konferencja Naukowa  
90 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów,  
PTM wczoraj – dziś – jutro  
Kraków, 22–23 września 2017 r.**

**Komunikat II**

Komitet Organizacyjny Konferencji Naukowej Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów zaprasza członków PTM szczególnie biorących udział w Nadzwyczajnym Walnym Zgromadzeniu Delegatów PTM oraz sympatyków Towarzystwa do uczestnictwa w Konferencji organizowanej w dniach 22–23 września w Krakowie.

Celem Konferencji będzie pogłębienie wiedzy w dziedzinie mikrobiologii, wprowadzenie zmian w statucie PTM, a także przypomnienie dorobku naukowego prof. Odonu Bujwida w 160 rocznicę urodzin przypadającą w 90-tą rocznicę powołania Towarzystwa.

Program naukowy konferencji obejmuje serię wykładów i sesje plakatowe.

Wykłady naukowe zaprezentują specjaliści z następujących dyscyplin mikrobiologii:

prof. Dariusz Bartosik, genetyka bakterii;  
prof. Marian Biniek, mikrobiologia weterynaryjna;  
prof. Katarzyna Czaczyk, mikrobiologia żywności;  
prof. Beata Gutarowska, mikrobiologia techniczna;  
prof. Waleria Hryniewicz, bakteriologia lekarska;  
prof. Zofia Piotrowska-Seget, biotechnologia środowisk;  
prof. Krzysztof Pyrc, wirusologia;  
prof. Ewa Swoboda-Kopeć, mykologia.

Prezentacje o charakterze historycznym dotyczące prof. Odonu Bujwida oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów przedstawiają:

prof. Małgorzata Bulanda  
prof. Jacek Międzobrodzki  
prof. Stefan Tyski

Zapraszamy uczestników Konferencji, zwłaszcza delegatów PTM, do zgłaszania doniesień naukowych w formie plakatów, których streszczenia zostaną opublikowane w materiałach konferencyjnych (maksymalnie 2 streszczenia/osobę). Precyzyjne informacje dotyczące szczegółów przygotowania streszczeń i prezentacji plakatowych zamieszczone są na stronie internetowej konferencji: [www.microbiology.pl](http://www.microbiology.pl).

Informacja o rekomendowanych hotelach i domach akademickich zlokalizowanych w bliskiej odległości od miejsca obrad znajdzie się na stronie internetowej konferencji.

Osoby zainteresowane uczestnictwem w Konferencji informujemy o ważnych terminach:

- Termin nadsyłania streszczeń plakatów: 2 czerwca 2017 r. (pierwotnie planowano 01.05.2017 r.).
- Termin powiadomienia autorów o akceptacji streszczenia doniesienia plakatowego: 15 czerwca 2017 r. (pierwotnie planowano 21.05.2017 r.).
- Konferencja rozpoczyna się w piątek 22 września 2017 r. w Auditorium Maximum UJ, ul. Krupnicza 33, Kraków.
- Rejestracja uczestników 22 września od godziny 16.00.
- Nadzwyczajne Walne Zgromadzenie Delegatów PTM 23 września 15.00–19.00.
- Zakończenie konferencji 23 września godz. 22.00.

**Opłaty konferencyjne:**

- Osoby do 35 roku życia (w tym studenci) członkowie PTM  
terminie do 30 czerwca 2017r.: 100 PLN;  
w terminie po 30 czerwca 150 PLN.
- Osoby do 35 roku życia (w tym studenci) nie będący członkami PTM – udział czynny  
w terminie do 30 czerwca 2017r.: 200 PLN;  
w terminie po 30 czerwca 250 PLN.
- Członkowie PTM  
w terminie do 30 czerwca 2017 r.: 300 PLN;  
w terminie po 30 czerwca 400 PLN.
- Osoby nie będące członkami PTM  
w terminie do 30 czerwca 2017r.: 400 PLN;  
w terminie po 30 czerwca 500 PLN.

Informacje dotyczące pozostałych spraw organizacyjnych można uzyskać pod adresem: [zjazdptm@cbm.com.pl](mailto:zjazdptm@cbm.com.pl) lub pod telefonem +48 66 535 52 55. Serdecznie zapraszamy Państwa do przyjazdu do Krakowa i aktywnego udziału w Konferencji.

Komitet Organizacyjny  
Konferencji Naukowej „PTM wczoraj – dziś – jutro”  
Kraków 22–23 września 2017 r.

**VI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa****MIKROBIOLOGIA FARMACEUTYCZNA 2017****Gdańsk 31.05–2.06.2017****Komunikat II**

Z prawdziwą przyjemnością zapraszamy do udziału w VI konferencji naukowo-szkoleniowej: **Mikrobiologia Farmaceutyczna 2017**, która odbędzie się w dniach 31.05–2.06 br. w Gdańsku. Tym razem zorganizowana zostanie przez **Polskie Towarzystwo Mikrobiologów** i **TRANSpharmacia**. Z dużą przyjemnością informujemy także, iż w ramach PTM powstaje długo oczekiwana przez nas sekcja **Mikrobiologia Farmaceutyczna**.

Nasza konferencja jest kontynuacją rozpoczętego w 2009 roku cyklu spotkań naukowo-szkoleniowych, którego celem jest stworzenie **Forum** specjalistów zainteresowanych mikrobiologią farmaceutyczną, umożliwiającego wymianę wiedzy, poglądów i doświadczeń w obszarach oceny i zapewnienia jakości, badań mikrobiologicznych oraz bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów leczniczych.

Podczas naszego spotkania przedstawimy szereg zagadnień istotnych dla Mikrobiologów pracujących w wytwórniach farmaceutycznych, laboratoriach mikrobiologicznych współpracujących z przemysłem farmaceutycznym, wydziałach farmaceutycznych uczelni, a także dla Osób Wykwalifikowanych, Specjalistów Zapewnienia i Kontroli Jakości, Audytorów oraz Osób odpowiedzialnych za współpracę z kontraktowymi laboratoriami mikrobiologicznymi.

Podczas konferencji tradycyjnie już przedstawimy aktualne i planowane zmiany w przepisach i wymaganiach farmakopealnych.

Tym razem dużo miejsca poświęcimy Laboratorium mikrobiologicznemu, jego roli w wytwórni, szkoleniom dla pracowników kluczowych, nie będących mikrobiologami. Przyjrzymy się również zagadnieniom istotnym w badaniach mikrobiologicznych i postępowaniu z wynikami. Zajmiemy się także jakością mikrobiologiczną produktów leczniczych i wyrobów medycznych obecnych na rynku.

Zastanowimy się także nad zakresem i sposobem przekazywania wiedzy mikrobiologicznej pracownikom Wytwórni Farmaceutycznych.

Kontynuujemy zapoczątkowaną na V Konferencji sesję pytań i odpowiedzi czyli dyskusję na tematy i omówienie problemów zgłoszonych wcześniej przez uczestników. Tematy można zgłaszać do 15 kwietnia.

Przewidujemy również stoiska wystawiennicze firm współpracujących z laboratoriami mikrobiologicznymi

A zatem czekamy na spotkanie z Państwem na szóstej konferencji naukowo-szkoleniowej **Mikrobiologia Farmaceutyczna 2017**. Pełna informacja i formularz zgłoszenia są dostępne na stronach:

Transpharmacia: <http://www.transpharmacia.pl/>

w zakładce szkolenia Polskie Towarzystwo Mikrobiologiczne: <http://www.microbiology.pl/>

W imieniu organizatorów z poważaniem

Barbara Kawałko-Myślińska  
Biuro Organizacji Konferencji

Prof. dr hab. Stefan Tyski  
Przewodniczący Rady Naukowo-Programowej

#### Rada Naukowo-Programowa

1. prof. dr hab. Stefan Tyski – przewodniczący
2. mgr Barbara Kawałko-Myślińska
3. mgr Krystyna Mysłowska
4. dr Tomasz Zaręba

#### Wykładowcy

**mgr Katarzyna Bucala-Śladowska** (CBMiA)

**mgr Marta Adamkiewicz-Alejziak** (Medana Pharma)

**mgr Michał Iwaniec** (DataComplex)

**dr Rafał Hałasa** (Gdański Uniwersytet Medyczny)

**dr Anne-Grit Klees** (Merck)

**dr Agnieszka Konopacka** (Gdański Uniwersytet Medyczny)

**mgr Karina Malczewska-Chaładaj** (Medana Pharma)

**dr Jadwiga Marczevska** (niezależny konsultant))

**dr Małgorzata Młynarczyk** (Biomed Warszawa)

**mgr Konrad Mysiakowski** (Galena)

**mgr Krystyna Mysłowska** (niezależny konsultant)

**dr inż. Dorota Nowak-Ziatyk** (BioMaxima SA)

**mgr Danuta Ostrowska** (GSK)

**dr Rafał Pokrowiecki** (Uniwersytet Medyczny Olsztyn)

**mgr Mirosław Popieluch** (DataComplex)

**mgr Izabela Rogala** (Medana Pharma)

**prof. dr hab.. Małgorzata Sznitowska** (Gdański Uniwersytet Medyczny)

**dr Katarzyna Turecka** (Gdański Uniwersytet Medyczny)

**prof. dr hab. Stefan Tyski** (Narodowy Instytut Leków, Warszawski Uniwersytet Medyczny)

**dr Tomasz Zaręba** (Narodowy Instytut Leków)

**mgr Anna Zawistowska-Rojek** (Narodowy Instytut Leków, Warszawski Uniwersytet Medyczny)

#### Miejsce

Gdańsk – Hotel Mercure Gdańsk Posejdon, ul. Kapliczna 30

#### Planowany Program Konferencji

1. Co nowego w Farmakopei
2. Nowe antybiotyki w badaniach klinicznych Udział Laboratorium Mikrobiologicznego w walidacjach procesowych, walidacji mycia i czyszczenia, kwalifikacji czystych pomieszczeń i walidacji systemów wodnych
3. Wskaźniki biologiczne – nowe podejście do kontroli sterylizacji
4. Kontrola żywek w laboratorium
5. Aspekty mikrobiologiczne podczas zwalniania serii
6. Szkolenia – edukacja mikrobiologiczna kluczowych pracownikom wytwórni farmaceutycznej (nie mikrobiologów)
7. Konserwanty – analiza skuteczności biobójczej, optymalizacja doboru związków
8. Jakość, świadomość, współpraca – efektywne kształtowanie indywidualnej odpowiedzialności
9. Badania mikrobiologiczne probiotyków

10. Jak analizować trendy zgodnie z wytycznymi i poprawnie statystycznie
11. Badania mikrobiologiczne próbek wody z rzeki Wisły w okolicach Warszawy
12. Badania implantów stomatologicznych pod kątem tworzenia biofilmu
13. Dystrybucja międzyfazowa środków konserwujących w dyspersjach
14. Częstotliwość badań mikrobiologicznych monitoringu środowiska dla produkcji – analiza ryzyka
15. Proces zarządzania i organizacji pracy w laboratorium mikrobiologicznym
16. Organizacja – optymalizacja pracy w laboratorium mikrobiologicznym
17. Kontrola mikrobiologiczna kosmetyków, w procesie wytwarzania oraz ocena poziomu ochrony produktu przed wtórnymi zakażeniami – test konserwacji
18. Skuteczność środków neutralizujących środki dezynfekcyjne
19. Zastosowanie technologii Biolog do identyfikacji mikroorganizmów

### ZGŁOSZENIE UCZESTNICTWA

Proszę wysłać faxem (22 398 39 48) lub e-mailem na adres: [transpharmacia@transpharmacia.pl](mailto:transpharmacia@transpharmacia.pl)

Lp.	Imię i nazwisko uczestnika (litery drukowane)	Tylko opłata konferencyjna	Nocleg 31.05–2.06 (dwa noclegi)	
			Dwuosobowy	Jednoosobowy
1.				
2.				
3.				

#### Osoba zgłaszająca:

Imię nazwisko	e-mail	Telefon kontaktowy

#### Dane do faktury VAT

Pełna nazwa firmy	
Adres	
Kod pocztowy, miejscowość	
NIP	

	Rejestracja do 8.04.2017	Rejestracja po 8.04.2017
Koszt uczestnictwa bez noclegu	1320,00 zł + VAT	1450,00 + VAT
Uczestnictwo i nocleg w pokoju dwuosobowym	1640,00 zł + VAT	1760,00 + VAT
Uczestnictwo i nocleg w pokoju jednoosobowym	1890,00 zł + VAT	1990,00 + VAT

#### Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów – 100,- zł zniżki

Druga osoba z tej samej firmy 10% zniżki (od opłaty podstawowej)

Trzecia osoba i więcej z tej samej firmy 20% zniżki (od opłaty podstawowej)

2. **Opłata obejmuje:** – udział w konferencji, wyżywienie podczas konferencji,  
– materiały konferencyjne (wersja papierowa i elektroniczna)

#### Sposób płatności:

Przelew: Transpharmacia – Millenium 57 1160 2202 0000 0001 1196 1446

#### Warunki rezygnacji (forma pisemna)

Do 5 dni rob. przed szkoleniem	Poniżej 5 dni	Nie zgłoszenie się na szkolenie bez uprzedzenia
Bez opłat	40% opłaty	100% opłaty –pełny koszt

#### 3. Biuro organizacji konferencji:

Barbara Kawałko-Myślińska [TRANSpharmacia](http://TRANSpharmacia) [transpharmacia@transpharmacia.pl](mailto:transpharmacia@transpharmacia.pl); tel +48 601382182



## KONFERENCJA BIOMILLENIIUM 2017

„Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii”  
Gdańsk, 6–8 września 2017 r.

### Komunikat I

Szanowni Państwo,

W imieniu Komitetu Organizacyjnego mamy zaszczyt zaprosić Państwa do udziału w **Konferencji BioMillennium 2017 – „Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii”**, która odbędzie się w dniach **6–8 września 2017 na terenie Politechniki Gdańskiej w Gdańsku**.

Głównym organizatorem Konferencji jest Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej oraz Gdański Oddział Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Współorganizatorami są również Katedra Mikrobiologii i Katedra Immunologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego oraz Gdański Oddział Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Chorób Zakaźnych.

Prezentowane zagadnienia będą podzielone na pięć tematycznych sesji: Biotechnologia: w medycynie, w przemyśle, w ochronie środowiska, Mikrobiologia: kliniczna oraz molekularna

Konferencja rozpocznie się wykładem przedstawiającym sylwetkę, zainteresowania i osiągnięcia naukowe zmarłego w tym roku Pana Prof. dr hab. Józefa Kura, założyciela Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej oraz naukowca, który swoimi pracami nie tylko wniósł wiele do mikrobiologii i biotechnologii, ale był ich wielkim popularyzatorem.

Przewidujemy wykłady plenarne, prezentacje ustne, sesję plakatową oraz warsztaty praktyczne prowadzone przez firmy. Mamy nadzieję, że prezentacje wyników Państwa badań naukowych pokażą, że biotechnologia nie jest wciąż dziedziną „nauki przyszłości”, ale już dziś przyniosła rozwiązania stosowane w wielu gałęziach przemysłu i w medycynie oraz że mikrobiologia nie jest „skostniałą dziedziną”, ale obszarem nauki, w którym zarówno tworzy się, jak i wykorzystuje nowoczesne technologie.

Wierzymy, że Konferencja będzie okazją do nawiązania kontaktów umożliwiających efektywną współpracę.

Wszystkim, którzy wezmą udział w Konferencji, życzymy miłego pobytu w Gdańsku. Szczegółowy program i informacje zostaną przesłane w następnym komunikacie.

Organizatorzy Konferencji BioMillennium 2017

Kontakt: 58 347 24 17 – sekretariat

oraz 58 347 23 83; 58 347 64 12; 58 347 24 06; 58 347 23 02



Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska  
– MIKROBIOT 2017  
Łódź, 19–21 września 2017 r.

“Microbiology in Health Care and Environmental Protection”  
– MIKROBIOT 2017  
Łódź, Poland, September 19–21, 2017.

### Komunikat I

W imieniu Organizatorów, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów mamy przyjemność serdecznie Państwa zaprosić do wzięcia udziału w **IV edycji konferencji naukowej „Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska” – MIKROBIOT 2017**, która odbędzie się w **Łodzi w dniach 19–21 września 2017 r.**

On behalf of the Organizing Committee, The Institute of Microbiology, Immunology and Biotechnology at the University of Lodz in Poland, together with Polish Society of Microbiologists, it is our great honor and pleasure to invite you to attend the 4<sup>th</sup> edition of scientific conference “**Microbiology in Health Care and Environmental Protection**” – **MIKROBIOT 2017**. This event will take place **in Lodz, Poland, September 19–21, 2017**.

The goal of the meeting is to provide opportunities for exchange ideas and research experience in the fields of microbiology, immunology and biotechnology, including microbial virulence factors, human immune response to infections, epidemiology, structure and physiology of environmental microorganisms, their use in biotechnological processes and in the removal of environmental pollution, as well as the role of microorganisms in their habitats and their relationships with other organisms.

As in the previous edition of the conference MIKROBIOT, which enjoyed great interest of the scientific community from all over Poland and met with appreciation from foreign visitors, during the upcoming 4<sup>th</sup> edition of MIKROBIOT 2017 plenary lectures will be given by eminent scientists, among others from Germany, Portugal, France or Italy. The official conference language will be English. During the conference MIKROBIOT 2017 four scientific sessions are provided for:

1. Clinical microbiology and immunology
2. Microbial biotechnology
3. General and environmental microbiology
4. Genetics and genomics of microbes



**Konferencja pod patronatem PTM**

**JUVENES PRO MEDICINA 2017**

**55 KONFERENCJA OGÓLNOPOLSKA I 13 KONFERENCJA MIĘDZYNARODOWA  
STUDENCKIEGO TOWARZYSTWA NAUKOWEGO UMIWERSYTETU MEDYCZNEGO  
W ŁODZI**

**Łódź, 19–20 maja 2017**

Juvenes Pro Medicina jest jedną z największych konferencji naukowo-szkoleniowych, odbywających się w centralnej Polsce. Konferencja ta odbywa się każdego roku od ponad 50 lat (pierwsza edycja konferencji miała miejsce w 1962 roku). Jest organizowana przez Studenckie Towarzystwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Nieodłącznym elementem konferencji Juvenes Pro Medicina są warsztaty seminaria i wykłady, kierowane do uczestników konferencji i wszystkich zainteresowanych. Zajęcia prowadzone są przez wykładowców naszej Uczelni oraz przez zagranicznych gości. Tematyka warsztatów/seminariów jest bardzo zróżnicowana – obejmuje zagadnienia medyczne, szkolenia z zakresu umiejętności społecznych, biostatystyki, warsztatów językowych. W poprzedniej edycji zainteresowani mogli wybrać spośród 10 rodzajów zajęć. Do tej pory sesja Basic Science, na której prezentowane są liczne prace m.in. z mikrobiologii, cieszyła się dużym zainteresowaniem uczestników, a znaczna część prezentowanych prac zaowocowała publikacjami w istotnych czasopismach medycznych. W związku z wysokim poziomem prac oraz zaangażowaniem znamienitych członków Jury, byłibyśmy wielce szczęśliwi, gdyby Polskie Towarzystwo Mikrobiologów doceniło nasz wysiłek w rozwój nauk podstawowych medycyny i objęło konferencję patronatem naukowym.

Więcej informacji o zeszłorocznej edycji Juvenes Pro Medicina znajdą Państwo na stronie:

**[www.jpm.umed.pl](http://www.jpm.umed.pl)**

**Konferencja pod patronatem PTM****II OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE  
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK”****Lublin, 29–30 czerwca 2017**

Celem Sympozjum jest podsumowanie dotychczasowej wiedzy i przedstawienie najnowszych osiągnięć w badaniach z zakresu metagenomiki, mikrobiologii, oddziaływań pomiędzy mikro- i makroorganizmami różnych środowisk oraz ich znaczenia dla rozwoju rolnictwa i ochrony środowiska.

Podczas konferencji zostaną zaprezentowane oraz przedyskutowane wyniki badań prowadzonych w ośrodkach naukowych, w tym także postęp w wykorzystaniu nowoczesnych metod badawczych w obszarze mikrobiologii środowiskowej. Przedstawione zostaną również dotychczasowe osiągnięcia na temat zastosowania narzędzi metagenomiki najnowszej generacji w badaniach środowiskowych. Sympozjum będzie miejscem wymiany doświadczeń, nawiązywania kontaktów do realizacji wspólnych projektów badawczych oraz wydarzeniem naukowym na temat kompleksowego rozpoznania bioróżnorodności mikroorganizmów w różnych środowiskach oraz najnowocześniejszych metod badawczych stosowanych w mikrobiologii, biologii molekularnej i biotechnologii.

Przewidujemy organizację następujących sesji naukowych:

- Sesja I – Narzędzia metagenomiczne – nowoczesne metody badań i identyfikacji mikroorganizmów i ich zbiorowisk;
- Sesja II – Metagenomika środowiskowa – metagenomy różnych środowisk;
- Sesja III – Metagenomika aplikacyjna – wykorzystanie i znaczenie metagenomiki w biotechnologii, biologicznej ochronie roślin oraz monitoringu jakości środowiska;
- Sesja IV – Czynniki wpływające na jakość środowiska – badania i aspekty praktyczne.

**Sekretariat Konferencji:**

Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej,  
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina, Instytut Agrofizyki PAN,  
ul. Doświadczalna 4, 20-290; Lublin  
tel. 81 744 50 61 w. 177, e-mail: metagenomy@ipan.lublin.pl

**Konferencja pod patronatem PTM****IX OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA HYDROMIKROBIOLOGICZNA****HYDROMICRO 2017:  
DROBNOUSTROJE – OSIĄGNIĘCIA I WYZWANIA****17–19 września 2017, Olsztyn**

Bardzo serdecznie zapraszamy na IX Ogólnopolską Konferencję Hydromikrobiologiczną, organizowaną w dniach od 17 do 19 września 2017 roku przez Katedrę Mikrobiologii Środowiskowej Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie. Będzie to dziewiąte ogólnopolskie spotkanie środowisk naukowych związanych z mikroorganizmami ekosystemów wodnych. Poprzednie spotkania odbywały się w: Słupsku-Ustce (2000), Toruniu (2002), Zielonej Górze – Łagowie (2004), Mikołajkach (2006), Warszawie – Wierzbie (2008), Gdańsku (2010), Wrocławiu (2013) oraz Gliwicach (2015).

Tematyka konferencji obejmuje: mikroorganizmy wód śródlądowych, podziemnych i morskich, mikroorganizmy w inżynierii środowiska, sanitarno – bakteriologiczne aspekty oczyszczania ścieków, transmisję mikroorganizmów patogennych drogą wodną, zanieczyszczenia biologiczne w systemach wodnych biobezpieczeństwo i bioremediację wód, diagnostykę organizmów wodnych, mikrobiologię przemysłową i biotechnologię.

Językiem konferencji jest język polski lub angielski. Zgłoszenia (w postaci wypełnionej karty zgłoszenia uczestnictwa – do pobrania ze strony [www.hydmicro2017.pl](http://www.hydmicro2017.pl)) należy przesłać do 30 maja 2017 roku na adres:

**[hydromicro@uwm.edu.pl](mailto:hydromicro@uwm.edu.pl)**

Streszczenia w języku polskim lub angielskim przygotowane wg schematu zamieszczonego na stronie Konferencji prosimy przesyłać drogą mailową do 30 czerwca 2017 roku.

Konferencja odbędzie się w Olsztynie, w atrakcyjnie usytuowanym hotelu Omega.

**W imieniu Komitetu Organizacyjnego**  
Dr hab. Zofia Filipkowska, prof. UWM



**Konferencja pod patronatem PTM**

**IV edycja konferencji**

**„Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości”**

**Wrocław, 24 listopada 2017**

Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów i Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego zapraszają na IV edycję konferencji pt. „Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości”.

Konferencja ma na celu prezentację badań z zakresu mikrobiologii i parazytologii jakie są prowadzone aktualnie w krajowych jak i zagranicznych jednostkach naukowych. Pragniemy również udokumentować historyczny dorobek polskich naukowców w tych dziedzinach. W tym roku szczególną uwagą objęty będzie problem uwarunkowanych środowiskowo chorób infekcyjnych i inwazyjnych, których czynnikami etiologicznymi są patogeny transmitowane przez stawonogi (wektory), głównie hematofagiczne kleszcze i komary, a także ukazanie skutecznych sposobów zapobiegania i monitorowania tych zagrożeń.

Podczas konferencji planowana jest prezentacja praktycznych osiągnięć 20-letniej współpracy Instytutu Genetyki i Mikrobiologii UWr z Wydziałem Środowiska i Rolnictwa Urzędu Miasta Wrocławia w zakresie biologicznego (mikrobiologicznego) zwalczania komarów na terenie Aglomeracji Wrocławskiej. Ważnym celem konferencji jest także integracja środowiska naukowego oraz ukazanie osiągnięć naukowych młodych adeptów nauki.

**Szczegółowe informacje zamieszczone są na stronie:**

<http://www.mikrobiologia.uni.wroc.pl>

**Organizator:**

Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii

**Miejsce:**

Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii  
ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław





### Konferencja pod patronatem PTM

#### 7 Międzynarodowa Konferencja Weiglowska Lwów, 26–29 września 2017 r.

<http://cellbiol.lviv.ua/2017/>

Rudolf Weigl był wybitnym polskim mikrobiologiem austriackiego pochodzenia. Pracował w czasach międzywojennych we Lwowie (dzisiejsza Ukraina) w dziedzinach mikrobiologii lekarskiej, parazytologii, immunologii oraz biotechnologii, opracowując przy tym pierwszą skuteczną szczepionkę przeciwko durowi plamistemu.

Mikrobiolodzy polscy i ukraińscy od 2003 r. organizują naprzemiennie w Polsce i Ukrainie dwustronne (później międzynarodowe) konferencje Weiglowskie w dziedzinie mikrobiologii i dyscyplinach pokrewnych. Poprzednie konferencje Weiglowskie odbywały się we Lwowie (2003), Warszawie (2007), Odessie (2009), Wrocławiu (2011), Czerniowcach (2013) oraz w Gdańsku (2015). Kolejną, 7 konferencję Weiglowską zaplanowano zorganizować we Lwowie, mieście, gdzie R. Weigl pracował.

Główne tematy konferencji to mikrobiologia ogólna, mikrobiologia lekarska, mikrobiologia środowiskowa, immunologia oraz biotechnologia. Konferencja odbędzie się w przepięknym Lwowskim Budynku Uczonych. Głównymi uczestnikami konferencji będą mikrobiolodzy ukraińscy i polscy, jednak przewiduje się także udział naukowców z innych krajów (Austria, Francja, Niemcy, Szwecja, Włochy, USA, Japonia). W konferencji weźmie udział około 250 uczestników. Oprócz programu naukowego, przewidziane są: wycieczka po Lwowie, koncert, recepcja oraz na życzenie – bankiet, spektakl w Operze Lwowskiej, a także wycieczka do pobliskich zamków. Konferencja przyczyni się do nawiązania bliższych kontaktów z naukowcami z Ukrainy oraz wzmocnieniu przyjacielskich stosunków między naszymi narodami.

Planuje się, że opłata konferencyjna wyniesie 140 Euro oraz 110 Euro dla młodych naukowców. Koszty obejmą 3 obiady, recepcję, 5 poczęstunków podczas przerw na kawę, wycieczka po mieście oraz materiały konferencyjne. Dodatkowo płatne będą bankiet (około 40 Euro) oraz spektakl w operze Lwowskiej (10 Euro). Po konferencji można będzie odwiedzić zamek Oleski (1 dzień), Poczajow i Krzemieniec (1 dzień) lub Kamieniec Podolski (2 dni), wycieczki te są płatne dodatkowo.

#### 7<sup>th</sup> International Weigl Conference (Lviv, September 26–29, 2017)

Rudolf Weigl was the outstanding Polish microbiologist of Austrian descent. He worked in the interwar period in Lviv (contemporary Ukraine) in the fields of medical microbiology, parasitology, immunology and biotechnology and created the first successful anti-typhus vaccine. Polish and Ukrainian microbiologists started in 2003 joint initiative to organize in turn in Ukraine and Poland bilateral (later, international) Weigl conferences in the fields of microbiology and related disciplines. Previous Weigl conferences took place in Lviv (2003), Warsaw (2007), Odessa (2009), Wrocław (2011), Chernivtsi (2013) and Gdansk (2015). The next, 7<sup>th</sup> International Weigl conference is planned to organize again in Lviv, the city, where he did his discoveries. The main topic of the conference will be general microbiology, medical microbiology, environmental microbiology, immunology and biotechnology. The conference is planned to be held in the beautiful House of Scientists. Main participants of the conference will be Polish and Ukrainian microbiologists, cell biologists and immunologists; however, participation of the scientists from many other countries is expected. Size of the conference is limited by 250 participants. In addition to scientific program, Lviv city tour, concert, get-together and optional banquet, visiting Lviv Opera House and the tours to neighboring castles are planned. Conference has to develop existing contacts and establish the new ones between Polish and Ukrainian scientists.

<http://www.cellbiol.lviv.ua/2017>  
Ukrainian Society of Cell Biology



7th International Weigl Conference  
September 26-29, 2017  
Lviv, Ukraine

For the attention of specialists in the field of microbiology, biotechnology, immunology.  
Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine, All-Ukrainian Public Organization "Ukrainian Society of Cell Biology" inform you about:

**7th International Weigl Conference** that will be held on September 26–29, 2017 in Lviv, Ukraine, in the main building of Ivan Franko Lviv National University.

List of planned sessions:

1. Microbial cell biology.
2. Microbial biotechnology.
3. Environmental microbiology.
4. Metabolism and regulation.
5. Medical microbiology.
6. Immunology.
7. Microbe-host cell interaction.
8. Microbial genetics.

Participation of leading foreign and ukrainian scientists is expected in the Conference.  
Working language – English.

**Conditions of participation:**

Deadline for Abstract submission – **May 31, 2017.**

Registration form and abstracts should be filled and sent to the conference e-mail:  
**weigl2017@gmail.com**

**Early bird registration & payment** (till May 31, 2017): 110 € / 90 €.

Materials received after the deadline will not be accepted. Each person may submit up to 3 abstracts.  
Invitation letters to the participants of the conference will be sent by email before 1<sup>st</sup> September 2017.

CONTACT INFORMATION  
OF ORGANIZING COMMITTEE REPRESENTATIVES

**Address:**

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv, 79005 Ukraine.

Dmytruk K.V., Head of Secretariat  
PhD, Senior Scientist  
Phone: 00 380 32 261 21 63;  
FAX: 00 380 32 261 2108,  
e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua // dmytruk77@gmail.com

Barska M.L., Executive Secretary  
of Ukrainian Society of Cell Biology, PhD  
Phone: 00 380 32 261 2142;  
FAX: 00 380 32 261 2108,  
e-mail: barska@cellbiol.lviv.ua

## SPIS TREŚCI

B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – Probiotyki, a układ odpornościowy przewodu pokarmowego ssaków .....	157
O. Goławska, M. Demkowska-Kutrzepa, E. Borzym, P. Różański, M. Zając, A. Rzeżutka, D. Wasyl – Mikroflora i parazytofauna obcych i inwazyjnych gatunków żółwi ...	163
A. Mierek-Adamska, W. Tylman-Mojżeszek, Z. Znajewska, G.B. Dąbrowska – Metalotioneiny bakteryjne .....	171
M. Kłós – Chorobotwórczość <i>Lactobacillus</i> sp. – czynniki ryzyka, identyfikacja, antybiotykooporność ..	180
K. Formińska, A.A. Zasada – <i>Francisella tularensis</i> – podstępny patogen .....	187
A. Paliwoda, A. Nowak – Czynniki warunkujące zdolności adhezyjne bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i> .....	196
E. Abramczuk, K. Pancer, W. Gut, B. Litwińska – Niepandemiczne koronawirusy człowieka – charakterystyka i diagnostyka .....	205
P. Zaleski, P. Wawrzyniak, A. Sobolewska, G. Płucienniczak – Plazmidy jako wektory do terapii genowej .....	214
J. Płaczkiewicz – Bakteryjne białka wielofunkcyjne .....	226
W. Kmiecik, E.M. Szewczyk – Gatunki koagulazododatnie rodzaju <i>Staphylococcus</i> – taksonomia, chorobotwórczość .....	233
RECENZJE .....	245
KOMUNIKATY, INFORMACJE .....	247

## CONTENTS

B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – Probiotics and mammalian gastrointestinal immune system	157
O. Goławska, M. Demkowska-Kutrzepa, E. Borzym, P. Różański, M. Zając, A. Rzeżutka, D. Wasyl – Microflora and parasitic fauna of alien and invasive turtle species ...	163
A. Mierek-Adamska, W. Tylman-Mojżeszek, Z. Znajewska, G.B. Dąbrowska – Bacterial metallothioneins .....	171
M. Kłós – Pathogenicity of <i>Lactobacillus</i> sp. – risk factors, identification, antibiotic resistance .....	180
K. Formińska, A.A. Zasada – <i>Francisella tularensis</i> – a deceitful pathogen .....	187
A. Paliwoda, A. Nowak – Factors determining the adhesive capacity of <i>Lactobacillus</i> bacteria .....	196
E. Abramczuk, K. Pancer, W. Gut, B. Litwińska – Non-pandemic human coronaviruses – characteristics and diagnostics .....	205
P. Zaleski, P. Wawrzyniak, A. Sobolewska, G. Płucienniczak – Plasmids – vectors for gene therapy .....	214
J. Płaczkiewicz – Bacterial moonlighting proteins .....	226
W. Kmiecik, E.M. Szewczyk – Coagulase-positive species of the genus <i>Staphylococcus</i> – taxonomy, pathogenicity .....	233
BOOKS REVIEWS .....	245
NEW REPORTS, INFORMATION .....	247

#### ERRATA

W artykule zatytułowanym „**Założenia i perspektywy wykorzystania żywych wektorów bakteryjnych we współczesnej wakcynologii**” (*Postępy Mikrobiologii* 55, str. 27, 2016) znalazł się błąd. Na Rysunku 4 błędnie opisano limfocyt T – zamiast oznaczenia „CD4<sup>+</sup>” znalazło się tam oznaczenie „CD8<sup>+</sup>”.

Za błąd bardzo przepraszamy.

*Katarzyna Roeske, Radosław Stachowiak i Jacek Bielecki*