Kwartalnik
Tom 57
Zeszyt 1•2018
STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:
PMKMAV 57 (1)
2018

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 111,53 (2015)
Impact Factor ISI = 0,311 (2016)
Punktacja MNiSW = 15,00 (2016)

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 RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOSŁAW 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), RADOSŁAW STACHOWIAK (zastępca), BOHDAN STAROŚCIAK (redaktor),
PIOTR ZALESKI (sekretarz), MARTA THOMSEN (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:

Adhezja komórek *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 do ludzkich komórek nabłonkowych linii HEC-1-B.
Preparatyka: mgr Jagoda Płaczkiewicz i dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.
Zdjęcie: dr Paweł Bącal, Pracownia Inżynierii Nanohybrydowych Biosystemów Regulacji, Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcza Polskiej Akademii Nauk.
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

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*

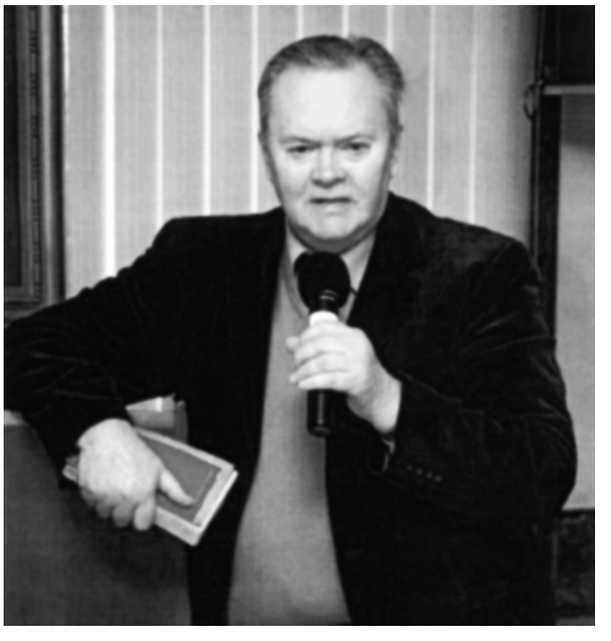
POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 3–4
http://www.pm.microbiology.pl

WSPOMNIENIE

prof. dr hab. Roman Mycielski (1933–2017)

28 listopada 2017 r. po długiej i ciężkiej chorobie zmarł prof. dr hab. Roman Mycielski, mikrobiolog, emerytowany profesor zwyczajny Uniwersytetu Warszawskiego.

Profesor Roman Mycielski urodził się 21 października 1933 roku we Wrześni, w pałacu na Opieszynie, siedzibie rodu Mycielskich. W 1939 roku został z rodziną wysiedlony z Wrześni przez Niemców i wywieziony do Radomia. W czasie wojny mieszkał w Warszawie i uczył się na tajnych kompletach organizowanych przez siostry zakonne. W 1944 roku wyjechał z matką i siostrami do Austrii i ostatecznie zamieszkali w Wiedniu. Po powrocie do Polski, w 1946 roku, znalazł się początkowo w Krakowie, a później w Jeleniej Górze. W 1948 roku Jego rodzina została wysiedlona z Jeleniej Góry, a Roman zamieszkał w bursie przy LO Maurycego Mochnackiego w Karpaczu. Już w szkole średniej wyraźnie interesował się przedmiotami przyrodniczymi. W 1951 roku zdał maturę, lecz ze względu na ziemiańskie pochodzenie nie został dopuszczony do egzaminu wstępnego na Uniwersytet im. Bolesława Bieruta we Wrocławiu.



Pomocną dłoń podał Mu prof. Ludwik Hirszfeld, kierownik Katedry Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu, zatrudniając Go jako laboranta w nieoficjalnej pracowni serologii zwierząt. Po pewnym czasie Roman Mycielski został kierownikiem tej pracowni i prowadził badania nad grupami krwi u psów. U prof. Hirszfelda pracował 2 lata. W latach 1953–1956 podejmował się różnych prac rzemieślniczych, aby zarobić na życie. W 1956 roku rozpoczął studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Po pewnym czasie, ze względu na brak na UJ kierunku związanego z mikrobiologią, przeniósł się na Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Warszawskiego, do Katedry Mikrobiologii. Studia ukończył w 1963 roku pracą magisterską „Częstość indukowanych promieniami UV mutacji powrotnych w synchronizowanej hodowli *Escherichia coli*", której opiekunem był prof. dr hab. Władysław Kunicki-Goldfinger.

W tej samej katedrze (przemianowanej w 1968 r. na Instytut Mikrobiologii) rozpoczął studia doktoranckie, podczas których kontynuował badania z zakresu genetyki bakterii. W roku 1969 obronił pracę doktorską pt. „Cykl życiowy *Escherichia coli* – problem replikacji genoforu oraz podziałów i rozdziałów komórek." Po doktoracie nadal zajmował się genetyką *Escherichia coli*, a w szczególności procesem koniugacji u tej bakterii, podjął także nieformalną współpracę z Zakładem Mikrobiologii Wody i Ścieków, kierowanym przez prof. dr. hab. Kazimierza Matusiaka. W 1975 r. przeniósł się do tego zakładu, kontynuując równocześnie badania w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, które były podstawą Jego rozprawy habilitacyjnej. Stopień doktora habilitowanego uzyskał w 1979 roku na podstawie pracy pt. „Zależności wydajności procesu koniugacji od formy cyklu życiowego komórek dawcy i biorcy u *Escherichia coli*".

W roku 1980, po przejściu na emeryturę profesora Matusiaka, dr hab. Roman Mycielski został kierownikiem Zakładu Mikrobiologii Środowisk (dawniej Zakład Mikrobiologii Wody i Ścieków). Kontynuował zarówno badania podstawowe różnych mikroorganizmów (glonów, bakterii nitryfikacyjnych, denitryfikacyjnych,

redukujących siarczany), wykorzystywanych w biologicznym oczyszczaniu gleby i ścieków, jak i podejmował próby ich praktycznego zastosowania w procesach bioremediacji środowiska. W tym czasie planował i nadzorował badania prowadzone w Terenowej Stacji Badawczej Biologicznego Oczyszczania Ścieków Instytutu Mikrobiologii UW przy Mazowieckich Zakładach Rafineryjnych i Petrochemicznych w Płocku, która powstała w 1968 r. Potrafił umiejętnie przekonywać chemików, inżynierów i techników współpracujących ze Stacją o konieczności stosowania biologicznych rozwiązań, prowadzących do poprawy jakości wody i gleby. Prowadził badania nad wykorzystaniem wyselekcjonowanych mikroorganizmów do biologicznego oczyszczania ścieków z fenoli, metali ciężkich i węglowodorów. Pracował również nad rekultywacją zaolejonej gleby, a także nad rozkładem fosfogipsów, powstających podczas produkcji nawozów sztucznych.

Profesor Mycielski był autorem ponad 40 prac naukowych z dziedziny genetyki bakterii i mikrobiologii środowisk. W latach 1978–1982 był sekretarzem naukowym *Postępów Mikrobiologii*. Od roku 1984 do 1991 był dyrektorem Instytutu Mikrobiologii. W 1989 roku uzyskał tytuł naukowy profesora. Był On nie tylko uznanym naukowcem, lecz również świetnym, charyzmatycznym wykładowcą. Potrafił w prosty i ciekawy sposób omawiać trudne i złożone zagadnienia z dziedziny mikrobiologii. Utrzymywał słuchaczy w skupieniu i zainteresowaniu, a Jego wykłady były pełne zabawnych dygresji, które odzwierciedlały jego wysoce rozwinięte poczucie humoru. Studenci uważali Go za jednego z najlepszych wykładowców Wydziału Biologii, a niektóre roczniki wręcz za najlepszego. Na emeryturze, na którą przeszedł w 2003 r., profesor Mycielski nadal prowadził różnego typu wykłady, np. dla studentów Podyplomowych Studiów Ochrony Środowiska na Wydziale Biologii UW oraz Wyższej Szkoły Przymierza Rodzin. Był też znakomitym popularyzatorem nauki.

Roman Mycielski interesował się nie tylko nauką, lecz również historią i sztuką naszego kraju. W latach 1959–1980 podczas wakacji i urlopów pracował w ekipie konserwatorów zabytków, ratujących polichromie ścienne w różnych niszczejących obiektach sakralnych (kościółki, kaplice, cerkwie), głównie w Bieszczadach. Działał niekiedy w bardzo prymitywnych warunkach, ale bardzo tę pracę lubił i miał poczucie, że przywraca kulturze polskiej coś, co mogłoby zostać bezpowrotnie utracone. W czasie tych wyjazdów poznawał wielu ludzi – cenił sobie rozmowy z nimi, bowiem uważał, że każdy z nich uczy go czegoś nowego lub przedstawia znane mu historyczne zdarzenia z innej perspektywy.

Profesor miał fenomenalną pamięć i był znakomitym gawędziarzem. Napisał dwie wspomnieniowe książki – „*Pałac na Opieszynie*" (Wydawnictwo LTW Łomianki, 2010) i „*Po zwycięstwie – Pałacu na Opieszynie ciąg dalszy*", wydanej w 2013 przez to samo wydawnictwo. Był wieloletnim redaktorem *Wiadomości Ziemiańskich* i autorem wielu tekstów zamieszczonych w tym czasopiśmie, jak również w *Biuletynie Ziemiańskim* i *Kwartalniku Wrzesińskim*.

Profesor był lubiany i szanowany przez współpracowników i studentów. Nie tylko doradzał im w sprawach naukowych, lecz również chętnie pomagał potrzebującym. W pamięci osób, które z nim pracowały, albo tylko się z nim na krótko zetknęły, pozostanie jako ciepły, serdeczny, przyjazny, pełen życzliwości dobry Człowiek.

Koleżanki i koledzy oraz byli współpracownicy
z Instytutu Mikrobiologii
Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 5–11
http://www.pm.microbiology.pl

ROLE OF MICROBIOTA IN MAINTAINING THE HOMEOSTASIS IN THE HUMAN BODY

Katarzyna Góralska[1]*, Magdalena Dzikowiec[2]

[1] Department of Biomedicine and Genetics, Chair of Biology and Medical Parasitology, Medical University of Lodz
[2] Department of Diagnostics and Treatment of Parasitic Diseases and Mycoses, Chair of Biology and Medical Parasitology, Medical University of Lodz

Submitted in June, accepted in October 2017

Abstract: The human body is believed to be occupied by around 4×10^{13} microorganism cells, which is 10 times the number of cells of the human body. Multidisciplinary studies conducted worldwide by microbiologists and physicians suggest that the microorganisms which colonize the human body can more actively influence the state of health than previously thought. The most important role in the regulation of the homeostasis is played by ontocenoses of the intestine. Imbalanced taxonomic composition and number of intestinal microbiota may contribute to the development of numerous infectious (HIV), metabolic (diabetes, obesity) and immunological (allergy, asthma, rheumatoid arthritis) diseases, as well as conditions associated with various organs (kidneys, liver, heart, inflammatory bowel disease, Crohn's disease), cancer (colon) and the nervous system (autism, sleeping problems, stress, chronic fatigue syndrome, schizophrenia, Alzheimer's disease). The composition of the intestinal microbiota can be modified by applying a specific type of diet.

1. Introduction. 2. Microbiota in the disorders of the immune system. 3. Microbiota in metabolic diseases. 4. Microbiota in cardiovascular diseases. 5. Microbiota in the disorders of the gastrointestinal tract. 6. Microbiota in renal diseases. 7. Microbiota in central nervous system disorders. 8. Regulation of microbiota through functional foods. 9. Conclusion

Udział mikrobioty w utrzymaniu homeostazy organizmu człowieka

Streszczenie: Ciało człowieka zasiedla około 4×10^{13} komórek mikroorganizmów, czyli 10 razy więcej niż liczba komórek ludzkiego organizmu. Wielodyscyplinarne badania prowadzone na całym świecie przez mikrobiologów i lekarzy sugerują, że mikroorganizmy, które kolonizują organizm człowieka, mogą bardziej aktywnie wpływać na stan zdrowia niż wcześniej sądzono. Najważniejszą rolę w regulowaniu homeostazy odgrywa ontocenoza jelita. Zaburzenia struktury taksonomicznej oraz liczby bakterii jelitowych mogą przyczyniać się do rozwoju licznych chorób zakaźnych (HIV), metabolicznych (cukrzycy, otyłości) i immunologicznych (alergii, astmy, reumatoidalnego zapalenia stawów), a także zaburzeń związanych z różnymi narządami (nerek, wątroby, serca, zapalenia jelit, choroby Crohna), raka (okrężnicy) oraz zaburzeń układu nerwowego (autyzmu, problemów ze snem, stresu, zespołu przewlekłego zmęczenia, schizofrenii, choroby Alzheimera). Skład mikroorganizmów jelitowych można regulować stosując konkretny rodzaj diety.

1. Wstęp. 2. Mikrobiota w zaburzeniach układu immunologicznego. 3. Mikrobiota w chorobach metabolicznych. 4. Mikrobiota w chorobach układu krążenia. 5. Mikrobiota w chorobach przewodu pokarmowego. 6. Mikrobiota w chorobach nerek. 7. Mikrobiota w zaburzeniach układu nerwowego. 8. Regulacja mikrobioty poprzez żywność funkcjonalną. 9. Wnioski

Key words: human health, natural microbiota
Słowa kluczowe: zdrowie człowieka, naturalna mikrobiota

1. Introduction

Multidisciplinary studies conducted worldwide by microbiologists and physicians suggest that the microorganisms that colonize the human body can more actively influence the state of health than previously thought. The human body is believed to be occupied by around 4×10^{13} microorganism cells, which is 10 times the number of cells of the human body. Depending on the location, between 10^4 and 10^{11} cells are found per 1 ml of content of digestive tract, while about 10^7 are found per 1 cm^2 on the skin [52]. Under correct homeostasis mechanisms, microorganisms form multi-species biological membranes composed of cells and extracellular matrix, known as biofilms. Commensal organisms are to a large extent responsible for controlling potentially pathogenic species by competition. Their presence stimulates the immune system by producing invasin and impedin, stimulates the production of interleukins IL17, IL22 and IL23 by leukocytes, and regulates the maturation of Th lymphocytes. They can also actively limit the growth of pathogens by producing bacteriocins and hydrogen peroxide, and by adjusting the pH of the internal environment of macroorganism [37, 42]. The gut microbiota plays an important role in the digestion of polysaccharides, proteins and fatty acids, allows the synthesis of group B vitamins and vitamin K, and promotes the absorption of minerals. The bacteria stimulate epithelial cell proliferation in the intestines, regulate gut motility, and degrade toxins and mutagens contained in foods [37, 42].

The studies performed as part of the Microbiome Human Project indicate that the microorganisms present in the human body have at least a million genes

* Corresponding author: Dr. Katarzyna Góralska, Department of Biomedicine and Genetics Chair of Biology and Medical Parasitology, Medical University of Lodz, Pomorska Str. 251, 92-213 Łódź; e-mail: katarzyna.goralska@umed.lodz.pl

whose products may affect the expression of human genes [22, 23]. Scientific reports suggest that the most important role in the regulation of the homeostasis is played by *ontocenoses* of the intestine, which can be defined as collections of organisms inhabiting the different sites of organism [29]. Disorders of the taxonomic structure and the number of intestinal microbiota may contribute to the development of numerous infectious (HIV), metabolic (diabetes, obesity) and immunological (allergy, asthma, rheumatoid arthritis) diseases, as well as conditions associated with the various organs (kidney, liver, heart, inflammatory bowel disease, Crohn's disease), cancer (colon) and the nervous system (autism, sleeping problems, stress, chronic fatigue syndrome, schizophrenia, Alzheimer's disease).

2. Microbiota in disorders of the immune system

Around 70–80% of the cells of the immune system are formed within the lymphoid tissue of the gastrointestinal tract [50]. Interactions between intraepithelial lymphocytes and gut microbiota occur via Toll-like receptors [13]. Intestinal bacteria increase the tightness of the intestinal barrier by regulating the expression of the structural proteins of the connections between the enterocytes and induction of the syntheses of immunoglobulin A [50]. The presence of the microbiota is important during the development of the lymphatic tissue of the intestine, as it stimulates the differentiation of intraepithelial lymphocytes and regulatory T-cells. Polysaccharide A produced by *Bacteroides fragilis* induces CD4 lymphocyte activity. The microbiota participates in maintaining homeostasis by regulating the number of helper and regulatory T lymphocytes. Studies on gnotobiotic mice found a decreased number of dendritic cells and CD4 lymphocytes in the gut and reduced intraepithelial lymphocyte activity compared to animals with normal microbiota [13]. However, lower numbers of the lactic acid bacteria *Bacteroidetes* and *Bifidobacterium*, but an increased amount of the coliform bacilli *Clostridium* and *Enterococcus* were seen in the intestine of people with allergic sensitisation. Studies in children have shown that contact in the first year of life with a wide diversity of bacteria in the environment and animal allergens correlated with a lower risk of allergic respiratory diseases [21].

Infants delivered by Caesarean section who possess a decreased number of *Bacteroides* and reduced diversity of *Bacteroidetes* in the gastrointestinal tract have been found to have an increased risk of developing various allergies [54]. Greater numbers of coliform and *Staphylococcus aureus* were found in the faeces of children presenting with food allergies associated with milk proteins and ovalbumin. In addition, children with eczema demonstrate less *Enterococcus* and *Bifidobacterium*, and more *Clostridium*. It has been shown that colonization of the neonate during the first week of life by lactic acid bacteria reduces the risk of allergic diseases in pre-school age [28].

In the early stages of rheumatoid arthritis, some patients showed a decreased number of intestinal *Bifidobacteria* and *B. fragilis* [56]. However, a significant increase in the prevalence of *Prevotella copri* was observed in patients in the early stages of the disease, which suggests that this species could play a role in inducing this disorder [28].

3. Microbiota in metabolic diseases

A disturbance of the natural balance of intestinal microbiota may be a predisposing factor to obesity. A reduced number of bacteria of the genus *Bacteroides*, and greater numbers of *Firmicutes* type (including *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Peptostreptococcus*) and the *Proteobacteria* family have been reported in patients with obesity compared to people of normal body mass [31]. Species more numerous in obese people are responsible for the increased fermentation of indigestible polysaccharides into bioavailable forms, the absorption of monosaccharides and short chain fatty acids from the gastrointestinal tract. The weight of the mother during childbirth has no effect on the composition of the intestinal microbiota in infants: it has been proven that the children of obese mothers have a similar microbiota to those of slim mothers. In contrast, the occurrence of dysbiosis and the development of obesity depends on eating habits and lifestyle [31]. In a study by Ley *et al.* [33], intestinal microbiota of obese and normal weight individuals were transplanted to gnotobiotic mice. All animals were then fed a low-calories, high-fiber diet. It was found that within two weeks, the mice that had received a transplant from an obese subject had an greater amount of body fat than those whose blots had come from an individual of normal weight. Cannabinoid receptors are also involved in the regulation of energy balance and the development of obesity. Cluny *et al.* [12] demonstrated that the administration of tetrahydrocannabinol (THC) to obese mice resulted in reduced energy demand and thus lower consumption of calories, and prevented increases in body weight induced by a high-fat diet. In animals with normal weight, the administration of THC did not change energy needs. In domestic chickens, infections with adenovirus Ad31, Ad36 and Ad37 were much more frequently diagnosed in obese birds, and non-obese individuals were more likely to have adenovirus Ad5 [46]. Almagren *et al.* [3] found a correlation between adenovirus Ad36 infection and prevalence of obesity in children in Sweden.

Significant differences in the composition and abundance of commensal microorganisms were observed in diabetes. Children with type 1 diabetes were found to have reduced numbers of bacteria of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* and the species *Eubacterium rectale*, and increased numbers of *Clostridium*, *Bacteroides* and *Veillonella* bacteria than healthy children [40]. In adults with type 2 diabetes, fewer *Clostridium* and *Firmicutes* bacteria and more *β-Proteobacteria* were observed [30]. Remely *et al.* [48] found significantly lower species diversity in people with diabetes compared to healthy subjects. Due to the greater abundance of *Enterobacteria*, including *Escherichia coli*, patients with diabetes are three to fifteen times more prone to infections caused by these bacteria. The introduction the genus *Bifidobacterium* to the diet of animals was associated with improved glucose tolerance, insulin secretion and normalized inflammatory tone and decreased endotoxemia [7].

4. Microbiota in cardiovascular diseases

Patients with an increased risk of cardiovascular disease were found to have a reduced number of *Alloprevotella* and *Catenibacterium* bacteria, and an increased number of *Prevotella* and *Tyzzerella* [26]. Many diseases of the circulatory system are caused by the deposition of atherosclerotic plaque, which is formed as a result of elevated levels of trimethylamine (TMA) and trimethylamine N-oxide (TMAO) in the blood serum. TMA is produced by gut bacteria from choline and short-chain fatty acids, and thereafter metabolized in the liver to TMAO. The pro-atherosclerotic effect of TMAO is associated with overactive platelets, increased macrophage foam cell information and reverse cholesterol transport. High levels of TMAO are associated with increased numbers of *Clostridiaceae* and *Peptostreptococcaceae* bacteria [55]. Emoto *et al.* [14] observed an increased number of bacteria from the phylum *Firmicutes* (*Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Enterococcus*), and reduced prevalence of phylum *Bacteroidetes* (*Bacteroides* and *Prevotella*) in patients with coronary artery disease. More opportunistic *Enterobacter*, *Megasphaera*, *Oscillibacter* and *Desulfovibro* and less commensal *Bacteroides*, *Prevotella* and *Faecalibacterium* are found in patients with myocardial infarction [24, 57]. Yin *et al.* [57] found that the exacerbation of myocardial infarction is associated with the progression of dysbiosis of gut microbiota. The administration of probiotics consisting of *Lactobacillus plantarum* and *L. curvatus* decreased triglyceride levels, increased the levels of apolipoprotein A-V and low-density lipoprotein cholesterol particle size in the blood serum [2].

5. Microbiota in the disorders of the gastrointestinal tract

Two types of inflammatory bowel disease can be distinguished: Crohn's disease and ulcerative colitis. The microbiota of Crohn's disease sufferers is poorer in *Bacteroides* and *Bifidobacteria*, and richer in *Enterobacteriaceae* [51], and a similar composition of intestinal microbiota which differs from that of healthy subjects can be seen between patients with Crohn's disease and their asymptomatic relatives. These results suggest the presence of sub-clinical inflammation in the relatives of patients with Crohn's disease. Ulcerative colitis is characterized by lower numbers of bacteria of the families *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*, and genus *Lactobacillus*, and an increased number of *E. coli*, which can serve as a biomarker of inflammation [34, 58]. Between 20 and 37% of patients with ulcerative colitis have also demonstrated co-invasion with *Candida* sp. By stimulating the production of proinflammatory cytokines IL-1β and TNF-α, the fungi delay the healing process and hinder treatment. The use of probiotics, and antifungal therapy in the course of ulcerative colitis, shortens the treatment time [59].

Patients with colorectal cancer present a reduced number of agents of the genera *Prevotella* and *Ruminococcus*, and the species *Pseudobutyrivibrio ruminis*. Bacteria of the genera *Acidaminobacter* and *Phascolarctobacterium*, and species *Citrobacter farmer* and *Akkermansia muciniphila* are more prevalent in intestinal ontocenoses [58]. The tumors of these patients were found to harbour the genetic material of *Fusobacterium nucleatum*: a species typical of the oral cavity which is responsible for the formation of dental plaque. Around 50% of the human population are infected with *Helicobacter pylori*, which in 1994 was officially recognized by the WHO as an etiological agent of cancer of the stomach and duodenum. In addition, *H. pylori* is responsible for 80% of gastric ulcer and 90% of duodenal ulcer cases [16].

The components of natural intestinal microbiota can produce substances with activity inhibiting the proliferation of tumor cells. Some of these compounds are colicin produced by *E. coli*, azurin by *Pseudomonas aeruginosa*, and LSL003, LSL 0510 and LSL 0554 by *Lactobacillus salivarius* [25, 41, 53].

6. Microbiota in renal diseases

There is a link between gut microbiota and chronic kidney diseases. Uremia alters the metabolism of intestinal bacteria, while the p-cresyl sulphate and indoxyl sulphate produced by the bacteria are involved in the development of renal diseases [9]. Greater numbers of

bacteria from 190 taxa, mainly from the family *Pseudomonaceae*, have been found in patients in the terminal stage of kidney disease, together with significant decreases in the numbers of *Lactobacillaceae* and *Bacteroidaceae* [15].

7. Microbiota in central nervous system disorders

Mental disturbances in patients have been associated with changes in the intestinal mucosa. This suggests a relationship between the CNS and the intestine, known as the microbiota-brain-gut axis. Of patients with schizophrenia, 92% present colitis, 88% inflammation of the small intestine, and 50% gastritis [50].

One of the main neurotransmitters responsible for mood, concentration, learning ability and the regulation of appetite and sleep is serotonin. Around 80–90% of serotonin is produced by the enterochromaffin cells of the intestine, whose activity is stimulated by more than 20 species of spore bacteria. Epidemiological data indicates that the serotonin level of children who died of sudden infant death syndrome (SIDS) was about 26% lower than in controls [4].

Changes in the levels of neurotransmitters associated with intestinal dysbiosis are more clearly visible in males. In studies of gnotobiotic animals, Clarke *et al.* [11] observed elevated levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the hippocampus and precursors of serotonin in the blood serum of males, resulting in greater anxiety, which regressed after normalizing microbiota. Reductions in the numbers of bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the intestine is observed in cases of sudden emotional stress. Literature data suggests that the genus *Bifidobacterium* is more sensitive to stress conditions and the physical activity of the host [50]. Rao *et al.* [47] note that patients with chronic fatigue syndrome who received *Lactobacillus casei* (*L. Casei Shitora*) demonstrated greater clinical improvements in neurological stage and increased number of lactic acid bacteria in the feaces compared to the control group. Freestone *et al.* [18] showed an increase in the numbers of non-pathogenic and pathogenic (0157: H7) strains of *E. coli* as a result of the interaction of stress hormones with host catecholamine.

Stress is associated with an elevation of corticotropin level, produced by *inter alia* intestinal enterochromaffin cells, and occludins, proteins which increase the permeability of the intestinal barrier by influencing the connections between enterocytes [35]. Permeability disturbances promote the translocation of bacteria and its products from the intestinal lumen and increased inflammation. Pro-inflammatory cytokines such as TNF-α, IFN-α and IFN-γ activate the enzyme 2,3-dioxygenase indoleamine in the kynurenine pathway, reduce the concentration of serotonin and increase the concentration of tryptophan metabolites [35]. While elevated levels of corticotropin and corticosterone were observed in gnotobiotic mice subjected to stress in another study, no such changes were observed in animals lacking certain microorganisms: administration of *Bifidobacterium infantis* to both groups of mice resulted in partial regression of symptoms of stress in the gnotobiotic animals and total regression in the other group [5].

γ-Aminobutyric acid (GABA) is responsible for inhibition of the inflammatory response and reduction of pain in the CNS, and any disturbances in the activity of GABA receptors can cause depression and anxiety attacks. The administration of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* bacteria activates GABA receptors and limits the symptoms of depression or anxiety. Animals with an experimentally damaged vagus nerve did not respond to the probiotic, which indicates that a link exists between the brain and gut microbiota via the vagus nerve [6].

As early as in 1910, Phillips observed positive results of treatment of depression and other psychiatric disorders associated with the use of lactic acid bacteria, while in 1923, Julianelle and Ebaugh recommended the use of *Bacillus acidophillus* in cases of psychosis [50].

Several drugs used in neurological and psychiatric disorders have a negative effect on the gut microbiota, resulting in increased inflammation of the mucous membrane, and can promote weight gain. Conversely, it was found that intestinal bacteria can inhibit the metabolism of psychotropic drugs such as benzodiazepine, clonazepam, risperidone and levodopa [49].

Numerous neurological symptoms, such as psychosis, anxiety attacks and depression, are common in people addicted to alcohol, most of whom also display a number of gastric disorders. Leclercq *et al.* [32] report significant intestinal barrier permeability (HIP) in 43% of alcoholics, and low intestinal barrier permeability (LIP) in 57%. Studies of the intestinal microbiota of HIP patients based on 16S rRNA found increased numbers of *Dorea*, *Blautia* and *Megasphaera* bacteria and reduced numbers of *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Subdoligranulum*, *Oscillibacter*, *Anaerofilum*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Faecalibacterium* bacteria, especially the anti-inflammatory species *F. prausnitzii*, whose presence is negatively correlated to the amount of inflammatory interleukin IL8. However, LIP patients demonstrated similar numbers of bacteria of these genera to those observed in the control group. After detoxification, reduced intestinal permeability and the regression of psychiatric symptoms were found in LIP patients, but not the HIP patients. The authors suggest that the HIP patients are more likely to return to addiction [32].

The structure of the intestinal microbiota of children with autism is significantly different from that of healthy children. Significant reductions in number are observed in the genera *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Streptococcus* (including hemolytic strains), *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Escherichia*; increased numbers was recorded in the bacterial genera *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Desulfovibrio* and the fungal genus *Candida*, especially *Candida albicans*, and dysbiotic yeast. The severity of symptoms are correlated with the severity of dysbiosis [1, 39, 45]. Grossi *et al.* [19] describe the case of 12-year-old autistic boy with gastrointestinal disorders, who for several years had unsuccessfully been treated for celiac disease. Further diagnosis suggested irritable bowel syndrome, and the child's diet was duly supplemented with a probiotic preparation containing *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus* and *S. salivarius*. Within a few weeks, the gastric disorders had disappeared; however, surprisingly, a simultaneous decrease of autism symptoms and a significant improvement in social affects were also observed [19]. Similar results were observed after the introduction of *Bacteroides fragillis* into the diet of mice with experimentally-induced autism with an increased intestinal permeability and abnormal cytokine profile [20].

Another study reported differences between patients with multiple sclerosis and healthy subjects with regard to the size and structure of microbiota. The population sizes were found to be different in as many as 21 species, 19 of which, mostly belonging to *Bacteroidetes* and *Clostridium*, demonstrated a significant decrease in number [38] Elsewhere, patients with multiple sclerosis were found to possess a reduced number of *Faecalibacterium* and vitamin D deficiency, which may be related to the content of short-chain fatty acids in the diet [8].

The most widely known species within the natural intestinal microbiota is *E. coli*, of which, some strains may be the etiological agent of human gastroenteritis. One of the most dangerous is O104: H4 *E. coli* strain, which produces a Shiga-like toxin. Kleimann *et al.* [27] describe an epidemiological outbreak caused by this strain which took place in northern Germany. Together with haemolytic-uraemic syndrome, the patients also presented psychiatric disorders, including attention deficit and memory disorder in 88%, disturbances of affect in 88% (up to 10 panic attacks a day), disorders of the driver and psychomotility in 84.8%, formal disorders of thoughts in 78.2% and organic psychiatric disorders in 58%. Elsewhere, a microarray assay of the *E. coli* proteome by Chen *et al.* [10] found differences in the protein compositions of the antigenic profiles of patients with bipolar disorder and 48 healthy people. The sensitivity of the identification of bipolar disorder patients was 75% and specificity approximately 80%. Accordingly, the authors suggest that the molecular profiles of certain bacterial species can be used as a sensitive assay for identifying neurological disorders.

8. Regulation of microbiota through functional foods

Recent years have seen increased interest in functional foods, which may be defined as products with generally-recognized nutritional value exerting a beneficial effect on one or more functions of the body. According to the International Life Sciences Institute, such food should strengthen the function of the body, improve well-being and reduce the risk of diseases, especially civilization diseases. Functional foods include, among others, probiotic bacteria, prebiotic oligosaccharides, bioactive peptides, natural antioxidants, vitamins, fiber, choline, lecithin and omega-3 fatty acids, but do not include any form of pills, tablets, syrups or drops, regardless of their beneficial effects on health [17]. The most popular group of functional foods are preparations such as yogurt or kefir which contain probiotics.

Recently, great interest has arisen in the bacteria *Mycobacterium vaccae*. *M. vaccae* is an aerobic bacterium commonly occurring in soil, and as a transient biota in animals. Mathews & Jenks [36] examined the effect of *M. vaccae* on the ability to think in studies in mice. Bacterial inoculate was administered to animals in food consisting of white bread and peanut butter, and the animals were placed in a maze. Experiments showed that mice fed with *M. vaccae* needed half of the time to go through the maze and committed fewer errors compared to mice on a normal diet. In addition the experimental mice showed lower levels of anxiety, the effect being maintained even after the administration of bacteria was completed. O'Brien *et al.* [43], in a clinical trial among patients in the terminal stage of lung cancer, observed improvements in emotional and cognitive function after administration of attenuated *M. vaccae*.

The composition of the intestinal microbiota can be adjusted by applying a specific type of diet. A diet rich in protein is associated with an increased number of *Alistipes*, *Bilofila* and *Bacteroides*, and reduced levels of the *Firmicutes* (*E. rectale*, *Ruminococcus bromii*). Physical activity is essential in this diet to avoid weight gain. A high-fat diet is associated with a higher level of *Firmicutes* and a lower level of *Bacteroidetes*. High fat content increases the permeability of the intestinal mucosa and increases its capacity for energy harvest and storage. The consumption of products containing a large amount of plant fiber is associated with higher levels of *Bifidobacteria* and lower levels of *Bacteroides*

and *Clostridium histolyticum*, and is associated with a lower risk of kidney cancer. Long-term observations suggest that variations in colon microbiota depend on the diet. The Western diet, based on eating large amounts of fat, is considered to be the least favourable for the balance of the intestinal microbiota; the Mediterranean diet on the other hand, is regarded as one of the most optimal diets with demonstrated beneficial effects in the treatment of Crohn's disease [44].

9. Conclusion

The analysis of available world literature indicates the very important role of natural microbiota in the proper functioning of the human body. Any kind of internal imbalance within individual ontocenoses, variations in the proportion of different groups of microorganisms and the occurrence of dysbiosis can result in health disorders. These disorders may be conducive to not only infectious diseases, but also metabolic, autoimmune, psychiatric, etc. Unfortunately, all the possible effects of microbiota changes are still unknown. On the other hand, many years of research indicate the possibility of regulating the composition of commensal microorganisms through the use of certain nutrients and supplementing the diet with beneficial bacteria.

References

1. Adams J.B., Johansen L.J., Powell L.D., Quig D., Rubin R.A.: Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism-comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol*. **16**, 11–22 (2011)
2. Ahn H.Y., Kim M., Chae J.S.: Supplementation with two probiotic strains, *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032, reduces fasting triglycerides and enhances apolipoprotein A-V levels in non-diabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*, **241**, 649–656 (2015)
3. Almgren M, Lavebratt C. i wsp.: Adenovirus-36 is associated with obesity in children and adults in Sweden as determined by rapid ELISA. *Plos One*, **7**, e41652 (2012)
4. Anderson P.: Sudden Infant Death Syndrome Due to Brainstem Serotonin Abnormality. *Medscape* – Feb 04, 2010. http://www.medscape.com/viewarticle/716500 (10.10.2017)
5. Bailey M.T., Coe C.L.: Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Dev. Psychobiol*. **35**, 146–155 (1999)
6. Bravo J.A., Forsythe P., Chew M.V., Escaravage E., Savignaca H.M., Dinan T.G.: Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16050–16055 (2011)
7. Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F., Knauf C., Burcelin R.G., Tuohy K.M.: Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat diet induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, **50**, 2374–2383 (2007)
8. Cantarel B.L., Waubant E., Chehoud C.: Gut microbiota in multiple sclerosis: possible influence of immunomodulators. *J. Investig. Med*. **63**, 729–734 (2015)
9. Carding S., Verbeke K., Vipond D.T., Corfe B.M., Owen L.J.: Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis*. **26**, DOI: 10.3402/mehd.v26.26191 (2015)
10. Chen P.C., Syu G.D., Chung K.H., Ho Y.H., Chung F.H., Chen P.H., Lin J.M., Chen Y.W., Tsai S.Y., Chen C.S.: Antibody profiling of bipolar disorder using Escherichia coli proteome microarrays. *Mol. Cell. Proteomics*, **14**, 510–518 (2015)
11. Clarke G., Grenham S., Scully P., Fitzgerald P., Moloney R.D., Shanahan F., Dinan T.G., Cryan J.F.: The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatry*, **18**, 666–673 (2013)
12. Cluny N.L., Keenan C.M., Reimer R.A., Le Foll B., Sharkey K.A.: Prevention of Diet-Induced Obesity Effects on Body Weight and Gut Microbiota in Mice Treated Chronically with Δ9-Tetrahydrocannabinol. *Plos One*, **10**, e0144270 (2015)
13. Croxford J.L., Miyake S.: Immunoregulation of multiple sclerosis by gut environmental factors. *Clin. Exp. Neuroimmunol*. **6**, 362–369 (2015)
14. Emoto T., Yamashita T., Sasaki N.: Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: a possible link between gut microbiota and coronary artery disease. *J. Atheroscler. Thromb*. **23**, 908–921 (2016)
15. Felizardo R.J.F., Castoldi A., Andrade-Oliveira V., Câmara N.O.S.: The microbiota and chronic kidney diseases: a double-edged sword. *Clin. Transl. Immunology,* **5**, e86. DOI: 10.1038/cti.2016. 36 (2016)
16. Fiedurek J.: Mikrobiom a zdrowie człowieka. Wydawnictwo UMCS, Lublin, 2014
17. Fiedurek J.: Rola żywności i żywienia w profilaktyce i terapii chorób człowieka. Wydawnictwo UMCS, Lublin, 2007
18. Freestone P.P., Williams P.H., Haigh R.D., Maggs A.F., Neal C.P., Lyte M.: Growth stimulation of intestinal commensal *Escherichia coli* by catecholamines: a possible contributory factor in trauma-induced sepsis. *Shock*, **18**, 465–470 (2002)
19. Grossi E., Melli S., Dunca D., TerruzziV.: Unexpected improvement in core autism spectrum disorder symptoms after long-term treatment with probiotics. *SAGE Open. Med. Case Rep*. **4**, 2050313X16666231. DOI: 10.1177/2050313X16666231 (2016)
20. Hsiao E.Y., Mazmanian S.K. i wsp.: Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, **155**, 1451–1463 (2013)
21. Huang Y.J., Boushey H.A.: The microbiome in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. **135**, 25–30 (2015)
22. Human Microbiome Project Consortium: A framework for human microbiome research. *Nature*, **486**, 215–221 (2012)
23. Human Microbiome Project Consortium: Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, **486**, 207–214 (2012)
24. Karlsson F.H., Fåk F., Nookaew I.: Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat. Commun*. **3**, 1245 (2012)
25. Kaur S., Kaur S.: Bacteriocins as potential anticancer agents. *Front. Pharmacol*. **6**, 272 (2015)
26. Kelly T.N., Bazzano L.A., Ajami N.J.: Gut microbiome associates with lifetime cardiovascular disease risk profile among. Bogalusa heart study participants. *Circ. Res*. **119**, 956–964 (2016)
27. Kleimann A., Toto S., Eberlein C.K., Kielstein J.T., Bleich S., Frieling H., Sieberer M.: Psychiatric symptoms in patients with Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 induced haemolytic-uraemic syndrome**.** *PLoS One*. **9**, e101839 (2014)
28. Kosiewicz M.M., Dryden G.W., Chhabra A., Alard P.: Relationship between gut microbiota and development of T cell associated disease. *FEBS Lett*. **588**, 4195–4206 (2014)

29. Kurnatowska A. (red.) Ekologia i jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy. Wyd. PWN Wrocław (1999)
30. Larsen N., Vogensen F.K., van den Berg F., Nielsen D.S., Andreasen A.S., Pedersen B.K., Abu Al-Soud W., Sorensen S.J., Hansen L.H., Jakobsen M.: Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *Plos One*, **5**, e90852 (2010)
31. Laursen M.F., Andersen L.B.B., Michaelsen K.F., Mølgaard C., Trolle E., Bahl M.I., Licht T.R.: Infant Gut Microbiota Development Is Driven by Transition to Family Foods Independent of Maternal Obesity. *mSphere* **1**, e00069–15 (2016)
32. Leclercq S., Delzenne N.M. i wsp.: Intestinal permeability, gut--bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 4485–4493 (2014)
33. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.: Human gut microbes linked to obesity. *Nature*, **444**, 1022–1023 (2006)
34. Machiels K., Vermeire S. i wsp.: A decrease of the butyrate--producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut,* **63**, 1275–1283 (2014)
35. Maes M., Leonard B.E., Myint A.M., Kubera M., Verkerk R.: The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **35**, 702–721 (2011)
36. Matthews D.M., Jenks S.M.: Ingestion of *Mycobacterium vaccae* decreases anxiety-related behavior and improves learning in mice. *Behav. Processes*, **96**, 27–35 (2013)
37. Maynard C.L., Elson C.O., Hatton R.D., Weaver C.T.: Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, **489**, 231–241 (2012)
38. Miyake S., Kim S., Suda W.: Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to *Clostridia* XIVa and IV clusters. *Plos One,* **10**: e0137429 (2015)
39. Mulle J.G., Sharp W.G., Cubells J.F.: The Gut Microbiome: A New Frontier in Autism Research. *Curr. Psychiatry Rep*. **15**, 337 (2013)
40. Murri M., Leiva I., Gomez-Zumaquero J.M., Tinahones F.J., Cardona F., Soriguer F., Queipo-Ortuno M.I.: Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: A case-control study. *BMC Med*. **11**, DOI: 10.1186/1741-7015-11-46 (2013)
41. Nguyen C., Nguyen V. D.: Discovery of Azurin – like anticancer bacteriocins from human gut microbiome through homology modeling and molecular docking against the tumor suppressor p53. *Biomed. Res. Int.* DOI: 10.1155/2016/8490482 (2016)
42. Nowak A., Libudzisz Z.: Mutagenic and carcinogenic metabolites formed by human colonic flora. *Post. Mikrobiol.* **43**, 321–339 (2004)
43. O'Brien M.E., Anderson H., Kaukel E., O' Byrne K., Pawlicki M., von Pawel J., Reck M.: SRL172 (killed *Mycobacterium vaccae*) in addition to standard chemotherapy improves quality of life without affecting survival, in patients with advanced non-small-cell lung cancer: phase III results. *Ann. Oncol.* **15**, 906–914 (2004)
44. Oriach C.S., Robertson R.C., Stanton C., Cryan J.F., Dinan T.G.: Food for thought: The role of nutrition in the microbiota-gut--brain axis. *Clin. Nutr. Exp.* **6**, 25–38 (2016)
45. Parracho H.M., Bingham M.O., Gibson G.R., McCartney A.L.: Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J. Med. Microbiol.* **54**, 987–991 (2005)
46. Ponterio E., Gnessi L.: Adenovirus 36 and obesity: An overwiev. *Viruses*, **7**, 3719–3740 (2015)
47. Rao A.V., Bested A.C., Beaulne T.M., KatzmanM.A., Iorio C., Berardi J.M., Logan A.C.: A randomized, double-blind, placebo--controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog.* **1**, DOI: 10.1186/1757-4749-1-6 (2009)
48. Remely M., Dworzak S., Hippe B., Zwielehner J., Aumüller E., Brath H., Haslberger A.: Abundance and Diversity of Microbiota in Type 2 Diabetes and Obesity. *J. Diabetes Metab*. **4**, DOI: 10.4172/2155-6156.1000253 (2013)
49. Rogers G.B., Keating D.J, Young R.L., Wong M-L., Licinio J., Wesselingh S.: From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol. Psychiatr.* **21**, 738–748 (2016)
50. Rudzki L., Szulc A.: Wpływ jelitowej flory bakteryjnej na ośrodkowy układ nerwowy i jej potencjalne znaczenie w leczeniu zaburzeń psychicznych. *Farmakoter. Psychiatr. Neurol.* **2**, 69–77 (2013)
51. Seksik P., Rigottier-Gois L., Gramet G., Sutren M., Pochart P., Marteau P., Jian R., Dore J.: Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, **52**, 237–242 (2003)
52. Sender R., Fuchs S., Milo R.: Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *Plos Biology*, DOI: 10.1371/journal.pbio.1002533 (2016)
53. Shaikin F., Abhinand P., Ragunath P.: Identification and characterization of *Lactobacillus salavarius* bacteriocins and its relevance in cancer therapeutics. *Bioinformation*, **8**, 589–594 (2012)
54. West C.E., Jenmalm M.C., Prescott S.L.: The gut microbiota and its role in the development of allergic disease: a wider perspective. *Clin. Exp. Allergy*, **45**, 43–53 (2015)
55. Yamashita T., Emoto T., Sasaki N., Hirata K.: Gut Microbiota and Coronary Artery Disease. *Int. Heart J*. **57**, 663–671 (2016)
56. Yeoh N., Burton J.P., Suppiah P., Reid G., Stebbings S.: The role of the microbiome in rheumatic diseases. *Curr. Rheumatol. Rep*. **15**, DOI: 10.1007/s11926-012-0314-y (2013)
57. Yin J., Liao S.X., He Y.: Dysbiosis of gut microbiota with reduced trimethylamine-N-oxide level in patients with large-artery atherosclerotic stroke or transient ischemic attack. *J. Am. Heart Assoc*. **4**, e002699 (2015)
58. Zhang Y.J., Li S., Gan R.Y., Zhou T., Xu D.P., Li H.B.: Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int. J. Mol. Sci*. **16**, 7493–519 (2015)
59. Zwolinska-Wcislo M., Pawlik W.W. i wsp.: Effect of Candida colonization on human ulcerative colitis and the healing of inflammatory changes of the colon in the experimental model of colitis ulcerosa. *J. Physiol. Pharmacol*. **60**, 107–118 (2009)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 12–21
http://www.pm.microbiology.pl

BIAŁKO HFQ – NOWE OBLICZA DOBRZE ZNANEGO RYBOREGULATORA

Grzegorz M. Cech*, Agnieszka Szalewska-Pałasz

Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii, Uniwersytet Gdański

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w listopadzie 2017 r.

Streszczenie: Białko Hfq jest jednym z lepiej poznanych czynników regulacyjnych działających na poziomie RNA. Na początku, białko to zostało odkryte jako czynnik komórki gospodarza niezbędny do rozwoju bakteriofaga Qβ. Od tego czasu rola białka Hfq w rozwoju fagów nie była szczególnie badana. Jednak w kolejnych latach, w wielu badaniach stwierdzono ryboregulacyjne funkcje tego białka. Polegają one na pośredniczeniu w oddziaływaniach pomiędzy małymi regulatorowymi sRNA a mRNA, będących celem ich działania. Odziaływania te mogą prowadzić zarówno do degradacji lub stabilizacji, zależnie od transkryptu. Białko Hfq posiada zdolność wiązania się do kwasów nukleinowych, i pomimo iż dużo chętniej wiąże się do RNA, może również wiązać się do DNA. Zaobserwowano, iż Hfq jest również jednym z białek organizującym nukleoid bakteryjny. Obserwacje te otwierają nowy rozdział w dyskusji na temat roli białka Hfq w regulacji replikacji DNA. Ponieważ białko Hfq wpływa na tak różne procesy biologiczne, nie jest wiec dziwne iż jego brak prowadzi do efektów plejotropowych.

1. Wprowadzenie. 2. Historia odkrycia oraz kontekst ewolucyjny białka Hfq. 3. Struktura białka Hfq oraz jego funkcje molekularne. 4. Charakterystyka komórek pozbawionych białka Hfq. 5. Interakcje białka Hfq oraz DNA. 6. Podsumowanie

The Hfq protein – a novel view on the well-known riboregulator

Abstract: The Hfq protein is one of the most important regulatory factors acting at the RNA level. This protein was first discovered as a host factor necessary for Qβ bacteriophage development. Following the discovery, the Hfq role in bacteriophage development was not investigated in depth. In subsequent years, however, many studies revealed various riboregulatory functions of this protein, mainly focused on facilitating sRNA and mRNA pairing, regulating both the degradation and stability of many transcripts. The Hfq protein has the ability to bind to nucleic acids – it binds more efficiently to RNA, but can also attach to DNA. It has been also proved that Hfq is involved in the nucleoid organization. These observations open room for discussion on the potential role of Hfq in the regulation of DNA replication. Since Hfq protein affects many cellular processes, the deletion of the gene encoding this protein has a pleiotropic effect on the cell.

1. Introduction. 2. The history of the Hfq protein discovery and its evolutionary context. 3. Structure of the Hfq protein and its molecular function. 4. Characteristics of cells devoid of the Hfq protein. 5. Hfq interactions with the DNA. 6. Summary

Słowa kluczowe: Białko Hfq, DNA, RNA, ryboregulacja
Key words: Hfq protein, DNA, RNA, riboregulation

1. Wprowadzenie

Białko Hfq jest jednym z kluczowych czynników regulatorowych, działających w komórce na poziomie RNA. Początkowo białko to zostało opisane jako czynnik niezbędny do rozwoju bakteriofaga Qβ, jednak rola tego białka w rozwoju bakteriofagów nie była później wnikliwie badana. W kolejnych latach opisywano natomiast wiele jego funkcji związanych z regulacją metabolizmu RNA, które w dużej mierze skupiają się na umożliwianiu interakcji pomiędzy sRNA a mRNA, jak również na udziale w procesach degradacji jak i stabilizacji wielu transkryptów. Białko Hfq posiada zdolność do wiązania się z kwasami nukleinowymi i, choć zdecydowanie silniej oddziałuje z RNA, wykazano również, iż wiąże się ono z DNA. Dzięki tym właściwościom może ono brać udział w organizacji nukleoidu. Otworzyło to nową drogę do spekulacji na temat potencjalnej roli białka Hfq w regulacji replikacji DNA. Ponieważ białko Hfq wpływa na wiele procesów komórkowych, efekty delecji genu kodującego to białko mają charakter plejotropowy.

2. Historia odkrycia oraz kontekst ewolucyjny białka Hfq

Białko Hfq (dawniej HF-1) zostało opisane na początku lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia jako czynnik niezbędny do replikacji bakteriofaga Qβ w komórkach gospodarza, jakim dla tego faga jest bakteria *Escherichia coli*. Stąd też wzięła się akronimiczna nazwa tego białka – Hfq, od angielskiego **h**ost **f**actor for **Q**β replication [15]. Już we wczesnych doniesieniach naukowych białko to charakteryzowane było jako niezwykle termostabilne i wykazujące silne powinowactwo do kwasów nukleinowych, szczególnie chętnie wiążące się z jednoniciowym RNA bogatym w powtórzenia adenina-uracyl (AU) [8, 12, 21, 43]. W kolejnych latach wykazano, iż białko Hfq należy do olbrzymiej rodziny białek wiążących się do RNA, które można odnaleźć prawie w każdym organizmie, należącym do wszystkich trzech domen drzewa życia (*Procaryota, Eucaryota* oraz *Archea*). Obecność ortologów genu kodującego białko Hfq, została potwierdzona

* Autor korespondencyjny: Grzegorz M. Cech; Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii, Uniwersytet Gdański, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk, Polska; tel. 58 523 60 65, fax: 58 523 60 25; e-mail: grzegorz.cech@biol.ug.edu.pl

w prawie połowie zsekwencjonowanych genomów bakteryjnych [31].

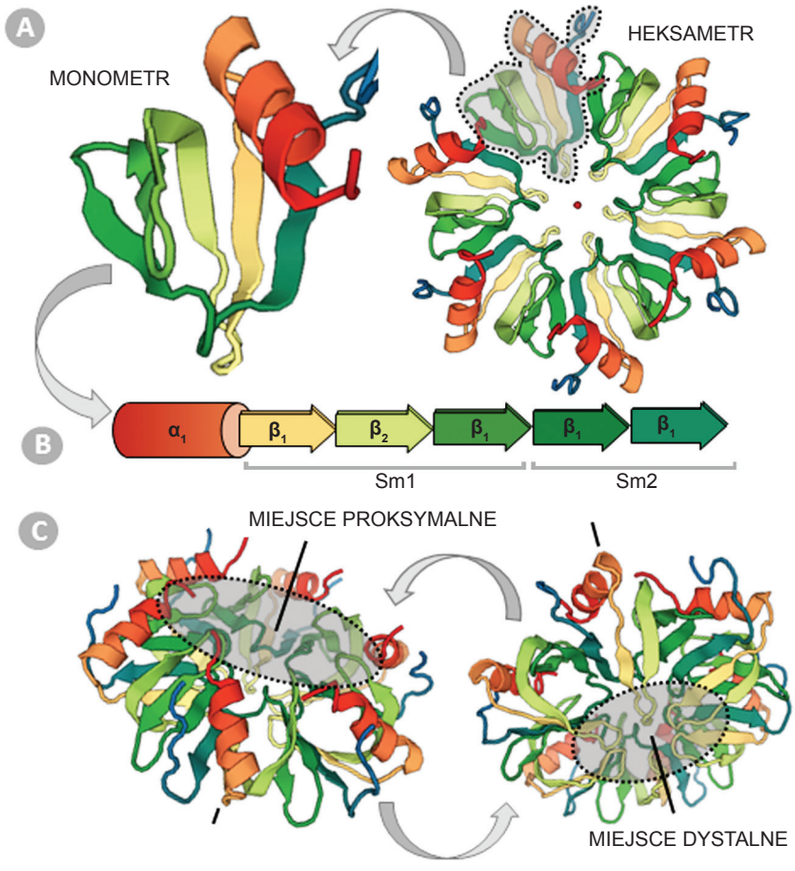
Homologami białka Hfq występującymi w królestwie zwierząt (*Metazoa*) są białka Sm oraz białka Sm-podobne (LSm), które możemy znaleźć w archeonach czy jednokomórkowych eukariontach. Zarówno białka Hfq, jak i białka z rodzin Sm czy Sm-podobnych mają wiele cech wspólnych, do których należy między innymi: multimeryczna czwartorzędowa struktura w kształcie pierścienia, umożliwiająca interakcje z makromolekułami oraz działanie w postaci czynników wiążących RNA, pełniących funkcję w regulacji post-transkrypcyjnej.

3. Struktura białka Hfq oraz jego funkcje molekularne

Białko to jest obecnie uważane za plejotropowy regulator ekspresji genów bakteryjnych, który moduluje translację mRNA poprzez umożliwianie interakcji z małymi regulatorowymi RNA (sRNA) [33, 57]. Interakcje takie możliwe są dzięki charakterystycznej strukturze białka Hfq.

Na jeden monomer białka Hfq składają się 102 reszty aminokwasowe. N-terminalna domena każdego monomeru składa się z pięciu β-nici, które tworzą silnie związaną strukturę β-kartki zwieńczoną przez strukturę α-helisy. Białko Hfq składa się z sześciu takich monomerów (Ryc. 1).

Struktury β-kartki z poszczególnych monomerów oddziałują z sobą tworząc toroidalną heksameryczna strukturę [7, 53]. Monomery zawierają konserwowane ewolucyjnie motywy zwane Sm1 oraz Sm2 mające długość 32 oraz 14 reszt aminokwasowych [19]. Motywy te są cechą charakterystyczną białek należących do szeroko rozumianej rodziny białek Hfq, Sm oraz Sm-podobnych, oraz dowodzą wspólnego pochodzenia ewolucyjnego tych białek. Motyw Sm1 jest silnie konserwowany ewolucyjnie w obrębie tej rodziny, należą do niego pierwsze trzy β-nici. Struktura ta jest otoczona przez motyw Sm2, na który składają się kolejne dwie β-nici. Motyw ten jest mniej konserwowany ewolucyjnie i różni się pomiędzy poszczególnymi homologami białka Hfq, jak również pomiędzy eukariotycznymi i archealnymi białkami Sm oraz Sm-podobnymi. Zmienność ewolucyjna tego motywu jest również powodem występowania różnej



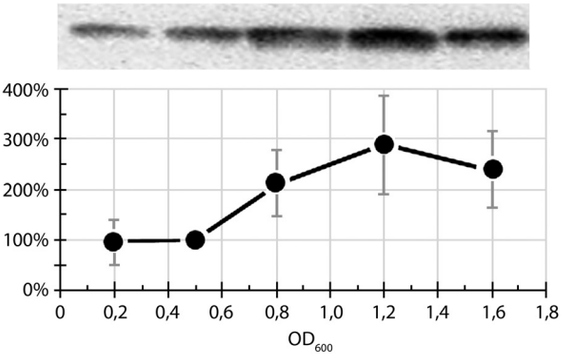
Ryc. 1. Struktura białka Hfq

Monomer oraz homoheksametr (panel A) z wyróżnionymi kolorystycznie strukturami α-helisy oraz β-nici z zaznaczonymi motywami Sm1 i Sm2 (panel B). Miejsca wiązania białka Hfq do kwasów nukleinowych, głównie RNA [57] (panel C). Obrazy Hfq na podstawie struktury 3QHS z bazy danych RCSB PDB (www.rcsb.org) [53].

liczby monomerów (oraz innych dodatkowych struktur) w ostatecznie funkcjonujących białkach, tworząc różne homo- i heterooligomery [36].

Pierścieniowa struktura białka Hfq ukazuje dwie strony, miejsce dystalne (distal face), oraz miejsce proksymalne (proximal face) (Ryc. 1, panel C), które są potencjalnymi miejscami oddziaływań tego białka z kwasami nukleinowymi. Pomimo, iż pełen mechanizm oddziaływań białka Hfq z RNA nie jest jeszcze poznany, wiadomo, że N-terminalna domena Sm, składająca się z około 65 aminokwasów, wiąże się z RNA [2]. Sekwencje RNA bogate w urydynę wiążą się do pierścienia Sm w części zwanej miejscem proksymalnym, natomiast sekwencje RNA bogate w adeninę wiążą się do części zwanej miejscem dystalnym, [25]. Niedawno zaproponowano, że strona boczna pierścienia Hfq (lateral face), zawierająca zachowane ewolucyjnie reszty argininowe, pełni rolę trzeciego miejsca wiązania RNA do Hfq [41], które jest ważne dla regulacji translacji niektórych mRNA [42]. Warto nadmienić, iż oprócz dobrze scharakteryzowanej domeny Sm, białko Hfq zawiera domenę C-terminalną, składająca się z około 35 reszt aminokwasowych. Wydaje się, iż domena ta nie posiada uporządkowanej struktury drugorzędowej a jej funkcja przez wiele lat pozostawała nieznana [57], jednak obecne odkrycia rzuciły nowe światło na rolę tej domeny. Jedna z zaproponowanych funkcji dotyczy udziału ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych tej domeny w zapewnieniu specyficzności oddziaływań białka Hfq z kwasami nukleinowymi [40]. Ponadto zaobserwowano, iż wyizolowana C-terminalna część białka Hfq posiada niezwykłe właściwości tworzenia wewnątrzkomórkowych struktur przypominających włókna. Opisano również, iż domena ta odpowiedzialna jest za wiązanie się cząsteczek białka Hfq w struktury wyższego rzędu, razem z innymi komponentami uczestniczącymi w szeroko pojętym przetwarzaniu RNA. Struktury przypominające włókna są zlokalizowane w sąsiedztwie błony wewnętrznej komórki i nie wpływają na zdolność białka Hfq do wiązania RNA. Już we wcześniejszych doniesieniach opisywane było, iż znacząca część tego białka jest wiązana z błoną komórkową, co łączono z jego rolą w regulacji degradacji RNA [3, 26]. Zrozumienie zarówno przestrzennego, jak i czasowego wiązania się białka Hfq, otwiera nowy rozdział w rozważaniach na temat ryboregulatorowych funkcji tego białka oraz regulacji post-transkrypcyjnej w czasie cyklu komórkowego [14].

W komórce bakteryjnej Hfq jest białkiem powszechnie występującym, zlokalizowanym również w cytoplazmie – jego stężenie wewnątrzkomórkowe szacuje się na około 10 μM. Początkowe badania opisywały, iż pewna frakcja tego białka związana była również z rybosomami [54], jednak późniejsze badania nie podtrzymują tej tezy [56]. Wewnątrzkomórkowy poziom białka Hfq wzrasta



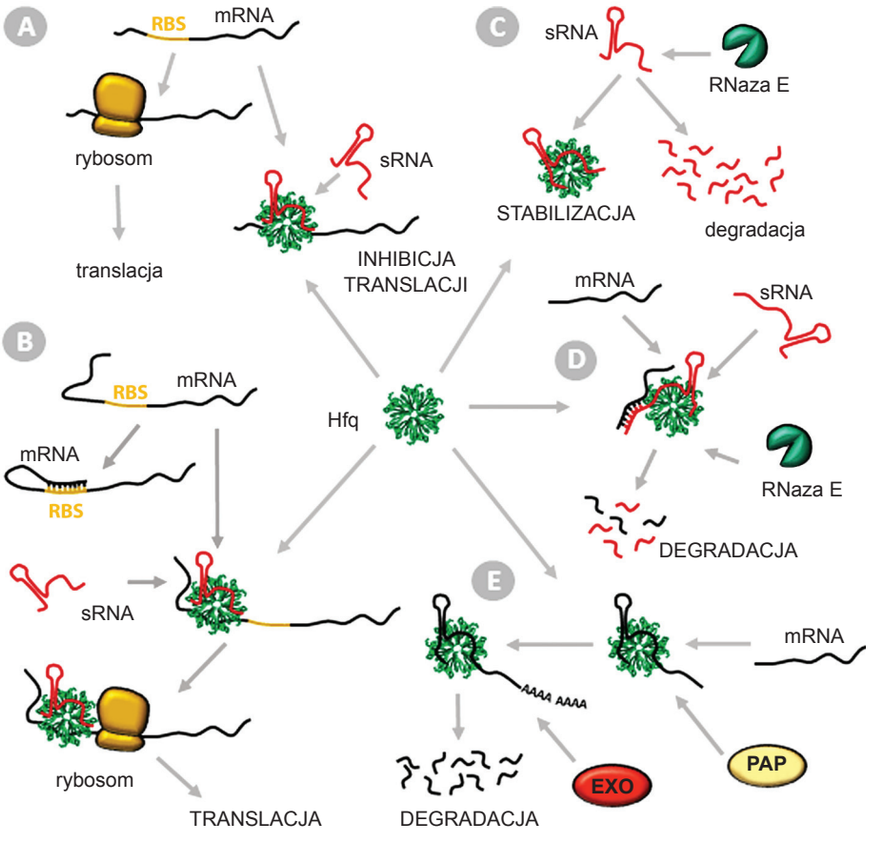
Ryc. 2. Relatywny poziom białka Hfq w komórce *E. coli* podczas wzrostu bakteryjnego

Górny panel prezentuje wizualizację zmian poziomu białka Hfq w komórkach typu dzikiego, podczas wzrostu (Western-blotting), dolny panel prezentuje te same zmiany w ujęciu ilościowym (na podstawie [54]).

w fazie stacjonarnej hodowli bakteryjnej względem fazy ekspotencjalnego wzrostu, Ryc. 2 [9, 13, 48], co eksponuje jego rolę w procesach zaangażowanych w regulację ekspresji genów związanych z fazą stacjonarną. Białko Hfq jest niezbędne do translacji mRNA dla podjednostki σ^S (białko RpoS) polimerazy RNA. Warunkuje to właściwą adaptację komórki bakteryjnej do stresu związanego z przejściem w fazę stacjonarną hodowli bakteryjnej [30]. Białko Hfq wpływa również na regulację poziomu innego białka niezbędnego w fazie stacjonarnej – białka FtsZ, które to tworzy strukturę pierścienia (tzw. pierścień Z) w obrębie miejsca przyszłego podziału komórki bakteryjnej [6, 55]

Białko Hfq związane jest z białkami zaangażowanymi w degradację mRNA takimi jak polimeraza poliadenylacyjna (PAP I), fosforylaza polinukleotydowa (PNP) czy RNaza E [22, 28]. Istnieje szereg scenariuszy, według których Hfq reguluje losy mRNA oraz sRNA (Ryc. 3).

Na ogół działanie białka Hfq odbywa się na poziomie regulacji translacji lub stabilności RNA. Niedawne badania z zastosowaniem technik wysokoprzepustowych ukazują bardzo liczne miejsca oddziaływań białka Hfq z cząsteczkami sRNA oraz mRNA w komórce bakteryjnej [27]. Jednym ze scenariuszy działania jest sytuacja, w której białko Hfq wraz z sRNA mogą blokować miejsce wiązania się rybosomów (RBS) w mRNA, co w konsekwencji powoduje zahamowanie translacji. W przypadku niektórych mRNA, struktura drugorzędowa końca 5' rejonu niepodlegającego translacji (UTR) może maskować miejsce wiązania się rybosomów (RBS), przez co może hamować translację, natomiast kompleks uformowany przez Hfq oraz specyficzne sRNA może aktywować translację poprzez umożliwienie ekspozycji RBS transkryptu dla podjednostki 30S rybosomu. W przypadku regulacji na poziome stabilności transkryptów, białko Hfq może chronić niektóre sRNA przed degradacją, często przeprowadzaną przez RNazę E lub, alternatywnie, Hfq



Ryc. 3. Możliwe scenariusze oddziaływania RNA z białkiem Hfq

Inhibicja translacji (panel A), promocja translacji (panel B), stabilizacja i ochrona sRNA przed degradacją (panel C), indukcja degradacji przez RNazę E (panel D), jak również współdziałanie z polimerazą poliadenylacyjną (PAP) w konsekwencji prowadzące do degradacji RNA z udziałem egzorybonukleazy (EXO) (panel E), (schemat własny, na podstawie [57]).

może indukować degradację sRNA oraz ich docelowych mRNA, przeprowadzaną przez RNazę E. Również indukcja degradacji może odbyć się w interakcji z polimerazą poliadenacyjną PAP I. W takim przypadku, Hfq może stymulować poliadenylację mRNA poprzez poli(A) polimerazę (PAP), co z kolei uruchamia degradację przez egzorybonukleazę [1, 10, 22, 28, 34, 52].

Przykłady oddziaływań Hfq z RNA:

(i) interakcja Hfq z mRNA genu *oxyS* w celu negatywnej regulacji translacji podjednostki RpoS polimerazy RNA [61]. OxyS jest małym regulatorowym RNA i pełni rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny, jak również pełni funkcje antymutatorowe.

(ii) Hfq wiąże się z transkryptem *ompA* (kodującym istotne białko błonowe) oraz jest niezbędne do stabilności tego transkryptu. Na stabilność tę wpływa *micA* – antysensowne RNA (ważny negatywny regulator wielu genów), które wiąże się również do mRNA *ompA* i blokuje wiązanie się rybosomów [50, 59, 60].

(iii) Hfq jest istotne w ochronie transkryptów przed degradacją stymulowaną przez RNazę E. Do takich transkryptów należą: *ompA* (koduje białko błonowe), *dsrA* (koduje ważny aktywator syntezy RpoS w fazie stacjonarnej oraz podczas wzrostu w niskich temperaturach), *ryhB* (obniża zapotrzebowanie na żelazo w warunkach jego niedoboru) [29].

Z powodu dużej różnorodności mRNA oraz celów działania sRNA, białko Hfq jest zaangażowane w regulację różnych ścieżek metabolicznych, z których należy wymienić transport cukrów, regulację ekspresji białek błonowych czy innych białek związanych z błoną komórkową, jak również zaangażowanie jest w regulację zmysłu gęstościowego komórki (quorum sensing) [5, 17, 37, 58].

4. Charakterystyka komórek pozbawionych białka Hfq

Z powodu wpływu białka Hfq na regulację licznych procesów komórkowych, mutacja Δ*hfq* charakteryzuje się plejotropowymi efektami. Wiele szczegółów charakterystyki fenotypowej mutanta *hfq::Ω* dostarczyła praca Tsui i wsp. z 1994 roku. W pracy tej użyto mutanta insercyjnego posiadający omega kasetę oporności na kanamycynę oraz dwa silne terminatory Rho-zależne na początku i na końcu kasety znajdującej

się wewnątrz genu *hfq*. Opisane zostało wtedy wiele cech fenotypowych, włączając w to zmianę morfologii komórki, obniżone tempo wzrostu, jak również wrażliwość na substancje zaburzające osmotyczność komórki czy na promieniowanie ultrafioletowe.

Ponadto mutant *hfq::Ω* charakteryzował się wzmożonym utlenianiem wielu różnych źródeł węgla i azotu. Do związków, których oksydacja była zwiększona w mutancie *hfq::Ω* względem szczepu typu dzikiego, należą: L-arabinoza, N-acetyloglukozamina, D-sacharoza, kwas bursztynowy, D-galaktoza, D-mannoza, D-seryna, D-sorbitol, glicerol, L-fruktoza, D-ksyloza, D-mannitol, D-ryboza, D-fruktoza, α-D-glukoza, D-melobioza, tymidyna, L-asparagina, α-ketoglutaran, α-D-laktoza, urydyna, maltotrioza, kwas cytrynowy, treonina, kwas fumarowy, L-seryna, L-treonina, L-alanina, i inne. Pobudzone utlenianie związków świadczy o ich utylizacji przez komórki – użycia ich jako podstawowego źródła węgla [49].

Zbadano również barwienie się komórek mutanta Δ*hfq* odczynnikiem DAPI, jednak nie zaobserwowano drastycznych zmian w kompozycji nukleoidu, to znaczy nie zaobserwowano ani jego zwiększonej ilości, ani wyglądu, ani komórek jego pozbawionych. Jednak, co interesujące, opisano wtedy wpływ mutacji Δ*hfq* na obniżenie superzwinięcia plazmidowego DNA w fazie stacjonarnej hodowli bakteryjnej [49].

Opisano również wpływ mutacji *hfq::Ω* na formowanie się łysinek bakteriofaga lambda. Zaobserwowano, iż mutant *hfq::Ω* nie podtrzymuje rozwoju bakteriofaga λcIts857 w temperaturze 30°C, jednakże zaobserwowano formowanie się łysinek fagowych bakteriofaga λvir, zarówno w temperaturze 30°C, jak i 42°C. Sugerowało to, iż białko Hfq może być potrzebne albo do adsorpcji cząstek bakteriofaga do powierzchni komórki albo do jego rozwoju litycznego [49].

W roku 2007 została opublikowana praca, w której opisano analizę pokazującą zmiany w transkryptomie bakterii pozbawionych funkcjonalnego białka Hfq w odniesieniu do szczepu typu dzikiego [18]. Analiza ta pozwoliła po części scharakteryzować wpływ mutacji w genie *hfq* na procesy wewnątrzkomórkowe, a przynajmniej opisać, w jakie procesy zaangażowane są geny, których poziom ekspresji uległ zmianie pod wpływem braku białka Hfq. Eksperyment ten wykonany został przy użyciu optycznych, dwubarwnych mikromacierzy DNA, a samą analizę poprzedzało pobieranie prób z hodowli bakterii będących w środkowej fazie logarytmicznego wzrostu ($OD_{450} = 0{,}3$), hodowanych w suplementowanej pożywce minimalnej M9 [18]. Zaobserwowano małe (lecz statystycznie istotne) zmiany w ekspresji 269 genów, jednak dalszej analizie poddano tylko te, których ekspresja uległa większej zmianie niż 1,5 raza względem kontroli. W ten sposób opisano i pogrupowano procesy regulowane przez białko Hfq. Należą do nich:

(i) Pobieranie przez komórkę aminokwasów oraz ich biosynteza. Zaobserwowano zmienioną ekspresję genów kodujących enzymy szlaków biosyntez kilku aminokwasów oraz stymulację ekspresji genów związanych z transportem aminokwasów oraz peptydów.
(ii) Transport cukrów oraz ich metabolizm. Większość białek transportujących, których ekspresja uległa obniżeniu w mutancie Δ*hfq*, zaangażowanych jest w pobór cukrów – zarówno tych z systemu fosfotransferazowego (np. egzogenne heksozy), jak i spoza niego (np.: maltoza, maltodekstryna). Dodatkowo geny, których ekspresja uległa obniżeniu w mutancie Δ*hfq* należą do szlaków glikolizy, fermentacji kwasowej czy syntezy etanolu lub N-acetylo-D-glukozaminy.
(iii) Metabolizm energetyczny komórki. Zaobserwowano obniżoną ekspresję genów zaangażowanych w łańcuch oddechowy (kodujących takie białka jak: dehydrogenaza mrówczanowa czy niektóre podjednostki syntetazy ATP [18].

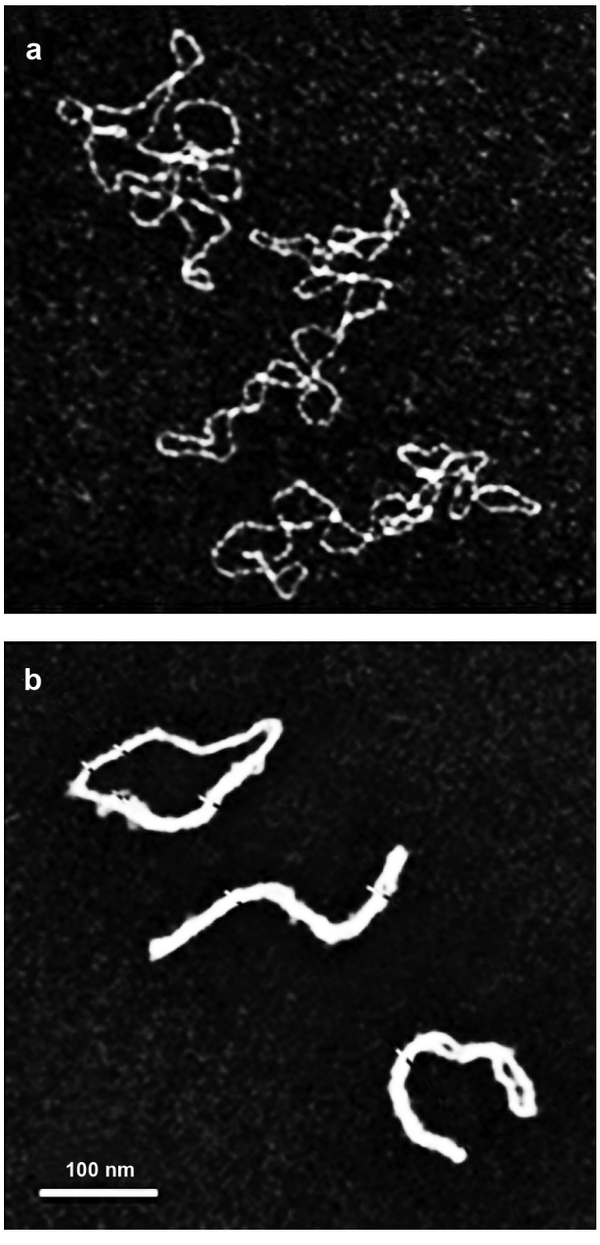
Hfq reguluje również aktywność podjednostki σ^E polimerazy RNA, odpowiedzialnej za ekspresję genów przystosowujących bakterie do ekstremalnego szoku cieplnego oraz stresu otoczki. Poziom mRNA genu *rpoE* jest podwyższony w mutancie *hfq*, co wpływa na kilka elementów regulonu σ^E, jednak jest to zależne od fazy wzrostu bakterii [18].

Białko Hfq reguluje również aktywność podjednostki σ^{32}, odpowiedzialnej za ekspresję genów związanych z odpowiedzią komórki na szok cieplny. Jednakże regulacja ta zachodzi nie poprzez obniżenie poziomu mRNA tej podjednostki, a poprzez wpływ na dwa białka opiekuńcze GroEL oraz DnaKJ, które regulują aktywność σ^{32}. W mutancie *hfq* zaobserwowano obniżony poziom zarówno białka GroEL, jak i jego mRNA. Jednak w przypadku białka DnaK zaobserwowano wzmożoną jego syntezę przy jednoczesnym niskim poziomie transkryptu. Sugeruje to bardziej złożony mechanizm działania tego białka opiekuńczego [18].

Liczne badania pokazują, jak brak funkcjonalnego Hfq wpływa na komórkę bakteryjną, przejawiając zmiany zarówno na poziomie transkryptomu jak i przekładając się na zmieniony fenotyp komórek. Pomimo ponad czterech dekad badań nad rolą i właściwościami białka Hfq, obraz jest ten ciągle jest niekompletny, choć wydaje się on złożony.

5. Interakcje białka Hfq oraz DNA

Już we wczesnych doniesieniach opisano biochemiczną charakterystykę białka Hfq wskazującą na wysoką termostabilność białka oraz silne powinowac-



Ryc. 4. Wiązanie się Hfq do DNA

Zdjęcia wykonane z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), superzwinięte plazmidy pBR322 (panel A) oraz te same plazmidy po krótkiej inkubacji (5 min) z białkiem Hfq (stosunek masowy 1:2) (panel B). Zdjęcia pokazują zdolność Hfq do tworzenia mostkowania segmentów DNA [18].

two do kwasów nukleinowych. Nawet jeżeli białko Hfq wydaje się preferować wiązanie się do RNA, wykazuje ono też znaczne powinowactwo do DNA (Ryc. 4). Te biofizyczne właściwości białka Hfq potwierdzone zostały w różnych doniesieniach na przestrzeni lat [4, 13, 16, 32, 51].

Możliwość wiązania się Hfq do DNA *in vitro* została szczegółowo zbadana przez Geinguenauda i współpracowników. Przy użyciu między innymi spektroskopii fourierowskiej (FTIR) oraz techniki rozpraszania neutronów (neutron scattering), udało się zaobserwować i potwierdzić częściowe rozplatanie się podwójnej nici DNA bogatej w reszty adeniny oraz tyminy, które stymulowane było przez wiązanie się białka Hfq. Jest to o tyle interesujące, iż jest zbieżne z generalną zawartością nukleotydową sekwencji promotorowych. Otworzyło to drogę do spekulacji na temat regulatorowej roli Hfq.

Zmierzono stałą równowagi dysocjacji (K_d) kompleksu Hfq:DNA przy użyciu fluorescencji anizotropowej. Dla kompleksów utworzonych z Hfq oraz DNA bogatego w powtórzenia adeninowe (dA_{20}), stała dysocjacji wynosiła $K_d = 180 \pm 22$ nM, natomiast dla kompleksów utworzonych z Hfq oraz dupleksów adenino-tyminowych ($dA_{20} - dT_{20}$), stała dysocjacji wynosiła $K_d = 250 \pm 14$ nM. Nie udało się natomiast zmierzyć, przy użyciu tej techniki, stałej dysocjacji dla kompleksów Hfq oraz DNA bogatego w cytozynę czy też dupleksy cytozynowo-guaninowe (dC_{20}, $dC_{20} - dG_{20}$). Co ciekawe, pomimo silnego powinowactwa do sekwencji DNA bogatych w adeninę, w przypadku dużego stężenia Hfq względem DNA, wiąże się ono niespecyficznie do DNA. Potwierdziły to obserwacje, z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, plazmidów inkubowanych wcześniej z różną ilością molową białka Hfq [16]. Wydaje się również, iż takie wiązanie się Hfq wymaga specyficznej lokalnej architektury DNA.

Zarówno część dystalna jak i C-terminalna domena białka Hfq, biorą czynny udział w interakcjach tego białka z DNA. Badania pokazały, iż zarówno delecja 37 reszt aminokwasowych domeny C-terminalnej, jak i dwie mutacje punktowe (K31A oraz Y25A), powodują całkowitą utratę zdolności wiązania się białka Hfq do DNA. Efekt wywoływany przez te mutacje jest dokładnie taki sam, jak delecja całego rejonu C-terminalnego. Postuluje się, iż C-terminalna część białka może kotwiczyć całe białko do DNA, natomiast reszty aminokwasowe w pozycji K31 oraz Y25 zapewniają powstawanie wiązań wodorowych niezbędnych do interakcji białka z DNA. Co interesujące, mutacja punktowa w pozycji R16A, która zlokalizowana jest na samej krawędzi białka, powoduje również całkowitą utratę właściwości wiązania się Hfq do DNA, natomiast mutacja R17A jedynie nieco zmienia sposób formowania się kompleksu Hfq-DNA. W związku z powyższym, strona boczna białka jest również postulowana jako element ważny dla wiązania się Hfq do DNA [51].

Updegrove i wsp. w trakcie oczyszczania białka Hfq natknęli się na fragmenty kwasów nukleinowych, które zostały zidentyfikowane jako fragmenty DNA. Fragmenty te cechowała helikalna, skręcona osiowo topologia [51]. Potwierdziło to wczesne doniesienia o silniejszym wiązaniu się Hfq do DNA o skręconej, zakrzywionej konformacji [4]. Jednakże niezwykle

ciekawym okazał się fakt, iż wyizolowane fragmenty były segmentami genów kodujących głównie białka błonowe (białka transportujące, symporty, antyporty, pompy aktywnego usuwania czy białka kanałowe) – 65% zidentyfikowanych sekwencji. Jest to dość niezwykłe jak na, mimo wszystko, niespecyficzne wiązanie się DNA do Hfq. Udało się również zidentyfikować wspólną sekwencję, z pomocą której fragmenty DNA wiązały się do Hfq – był to motyw (A/T)T(A/G)TGCCG [4]. Motyw ten różni się od opisywanych przez Geinguenauda i wsp. sekwencji bogatych w powtórzenia adeninowe [16]. Geny zidentyfikowane wśród wyizolowanych fragmentów DNA nie kodowały żadnego mRNA podlegającego Hfq-zależnej regulacji, nie flankowały również rejonów międzygenowych kodujących regulatorowe sRNA. Jednakże, kiedy sekwencja genomu *E. coli* została przeszukana pod kątem wyżej wymienionego motywu, okazało się, iż odnaleziono dokładnie 924 miejsca występowania tego motywu, a więc miejsca wiązania się białka Hfq do chromosomu bakteryjnego. Zapewne w przypadku przeszukania chromosomu pod kątem motywu o mniejszej konserwatywności, liczba znalezionych miejsc wiązania byłaby jeszcze większa [51]. Szacuje się, iż jeżeli tylko jedna cząsteczka heksameru białka Hfq przypadałaby na jedną sekwencję motywu, to około 15% całej komórkowej puli białka Hfq znalazłoby się w obrębie nukleoidu. Wyniki te potwierdziły wcześniejsze doniesienia, iż pewna frakcja białka Hfq (10–20%) związana jest z chromosomem bakteryjnym [24].

Jest to zbieżne z innymi badaniami, które opisywały białko Hfq jako jedno z 12 najliczniej reprezentowanych białek w nukleoidzie bakterii *Escherichia coli*, a jego udział procentowy szacowany był na około 25% wszystkich białek związanych z nukleoidem bakteryjnym w stacjonarnej fazie wzrostu [47]. Ilość tego białka w nukleoidzie jest porównywalna z innymi charakterystycznymi białkami nukleoidu, takimi jak Fis czy HU. W związku z tym, białko Hfq jest obecnie opisywane również jako jedno z białek organizujących nukleoid bakteryjny oraz jako białko współdziałające z innymi białkami nukleoidu. Obok wyżej wspominanych białek Fis oraz HU, wymieniane są białka: IHF, H-NS, czy StpA [32] W fazie logarytmicznego wzrostu struktura nukleoidu opisywana jest jako chromatyna o średnicy od 30 do 80 nm. Ta sama chromatyna ulega znaczącej kondensacji po wejściu komórek w fazę stacjonarną [32]. Wiele badań *in vitro* pokazało, iż chromosomalne białka, takie jak HU, IHF, H-NS, StpA, Fis, oraz Hfq, w różny sposób wiążą się z cząsteczkami DNA [11, 32, 35, 44–46]. Jednakże nie do końca poznany jest mechanizm ich współdziałania *in vivo*. Badania organizacji nukleoidu z użyciem mikroskopii sił atomowych wykazały, iż chromosomy bakteryjne, selektywnie pozbawiane wyżej wymienionych białek, wykazywały zróżnicowanie grubości chromatyny w uwalnianym nukleoidzie. Wyizolowany ze szczepu typu dzikiego nukleoid składa się w ponad 10% z populacji cienkich nici chromatynowych (definiowanych jako nici o grubości od 5 nm do 20 nm) oraz zawiera mniej więcej tyle samo nici grubych (powyżej 70 nm). Natomiast największą część populacji (powyżej 70%), stanowią intermediaty o grubości od 20 nm do 70 nm. Efekty delecji niektórych spośród wspomnianych białek powodowały zwiększenie częstości występowania grubszych nici, podczas gdy innych powodowały częstsze formowanie się nici cienkich. W przypadku mutanta Δ*hfq* zaobserwowano zarówno zwiększenie populacji nici cienkich (powyżej 20%) jak i grubych (ok. 20%). Jednakże żadna pojedyncza mutacja nie spowodowała istotnego statystycznie wzrostu częstości pojawienia się nici najcieńszych, definiowanych jako te poniżej 5 nm średnicy. Została postawiona hipoteza, iż żadne z wyżej wymienionych białek nie jest konieczne do formowania się chromatyny z nagiego DNA do struktur wyższego rzędu. Badania te pokazały, iż formą podstawową chromatyny jest chromatyna o średnicy 10 nm a wyizolowany chromosom poddany traktowaniu RNazą A przekształca się właśnie w chromatynę o średnicy 10 nm. Do jej formowania się niezbędne są wprawdzie różne białka oraz proces superzwinięcia DNA, jednak nie są niezbędne białka HU, IHF, H-NS, StpA, Fis czy Hfq, zaś efekt braku któregokolwiek z nich jest kompensowany przez pozostałe białka [32].

W 2015 roku ukazała się praca, w której bliżej przyjrzano się problemowi wiązania się Hfq do DNA oraz jego roli w konformacji oraz upakowaniu DNA [23]. W pracy tej wykorzystano wiele zaawansowanych technik, w tym użycie nanofluidów w kwazi-jednowymiarowych kanałach w połączeniu z mikroskopią fluorescencyjną czy technika omiatania neutronami o niskich kątach (SANS, Small Angle Neutron Scattering). Za pomocą pierwszej z tych technik udało się zaobserwować i zmierzyć kondensację DNA pod wpływem różnych czynników, a w szczególności białka Hfq. Z kolei technika omiatania neutronami umożliwiła szczegółowe zobrazowanie oddziaływania cząsteczek DNA oraz C-terminalnej domeny białka Hfq. Zaobserwowano, iż Hfq posiada zdolności do łączenia segmentów DNA, co prowadzi do upakowania DNA, a finalnie skutkuje raptownym przejściem do stanu skondensowanego DNA. Jednakże dzieje się tak dopiero po przekroczeniu pewniej wartości progowej w stężeniu białka Hfq względem DNA. Zasadnicze znaczenie w tej kondensacji DNA mają interakcje pomiędzy segmentami DNA kontrolowane zarówno poprzez oddziaływania elektrostatyczne, jak i sam układ segmentów [23]. Wyniki te eksponują rolę białka Hfq w organizacji architektury nukleoidu i bardziej bezpośredni wpływ na regulację ekspresji genów. Z kolei wyniki doświad-

czeń omiatania neutronami wykazały, iż heksamer białka Hfq nie jest sztywno zakotwiczony a raczej jest luźno związany w odległości około 5 nm od helikalnej osi dupleksu nukleoproteinowego. Obecnie rozważany model zakłada, iż C-terminalna część białka Hfq wiąże się z sekwencjami bogatymi w powtórzenia AT. Wymaga to jednak częściowego otwarcia się dupleksu, co z kolei skutkuje skróceniem się (pozornym, bo tylko w obrysie) cząsteczki DNA. Kiedy już heksamer Hfq przyłączy się jedną z C-terminalnych domen do DNA, może przyłączyć kolejne segmenty DNA do pozostałych domen C-terminalnych – w ten sposób właśnie tworzy się „mostkowanie" DNA w konsekwencji prowadzące do raptownego przejścia DNA w stan skondensowany [23].

Interakcje białka Hfq z DNA otworzyły nowy rozdział w rozważaniach na temat roli tego białka w regulacji replikacji DNA. Rola ta została wyeksponowano jak do tej pory jedynie jednym doniesieniem naukowym, gdzie użyto jako modelu replikacji różnych replikonów plazmidowych. W mutancie Δ*hfq* zbadano wydajność replikacji plazmidów ColE1 podobnych (pMB1 oraz p15A) jak również pochodnej bakteriofaga λ – plazmidu pKBamp. W przypadku komórek pozbawionych białka Hfq, w porównaniu do szczepu typu dzikiego, zaobserwowano wydajniejszą syntezę DNA plazmidów ColE1 – podobnych. Tę wydajniejszą syntezę zaobserwowano pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu i na początku fazy stacjonarnej. Jest to zbieżne z fizjologicznym wzrostem stężenia białka Hfq w komórkach szczepu typu dzikiego [9]. Co interesujące, nie zaobserwowano efektu wzmożonej replikacji dla plazmidu będącego pochodną faga λ. Ponieważ regulacja replikacji plazmidów ColE1 wymaga specyficznych oddziaływań na poziomie RNA, wydaje się, iż brak głównego białka opiekuńczego RNA może zaburzać proces tej regulacji, prowadząc do stymulacji replikacji DNA [9]. Jednak biorąc pod uwagę iż brak białka Hfq wywołuje w komórce liczne efekty plejotropowe, może być to tylko jeden z możliwych scenariuszy działania białka Hfq.

Oprócz wymienionych powyżej bezpośrednich i pośrednich oddziaływań białka Hfq z DNA oraz ich skutków, zaobserwowane zostały również inne efekty pośrednie działania białka Hfq na procesy związane z DNA. Do takich należy zaliczyć rolę białka Hfq w procesie regulacji transpozycji. Badania wykazały, iż Hfq negatywnie reguluje transpozycję transpozonu *Tn10* poprzez inhibicję transpozazy IS50 na post-transkrypcyjnym poziomie. Zaobserwowano również silną supresję procesu transpozycji dla transpozonu *Tn5*, jednak w tym przypadku regulacja odbywa się na poziome zahamowania transkrypcji transpozazy IS50. Zidentyfikowano, iż czynnikiem pośredniczącym w tej regulacji jest Crp, białko receptora cyklicznego AMP [38, 39].

6. Podsumowanie

Białko Hfq jest jednym z kluczowych ryboregulatorów, którego działania w dużej mierze polegają na umożliwianiu interakcji pomiędzy sRNA a mRNA, jak również na udziale w procesach degradacji i stabilizacji transkryptów. Strukturalnie białko to jest homoheksamerem o strukturze pierścienia. W jego budowie można wyróżnić dwie strony, stronę proksymalną i dystalną, które są odpowiedzialne za wiązanie się białka Hfq z kwasami nukleinowymi. Choć zdecydowanie silniej oddziałuje z RNA, wykazano również, iż wiąże się ono z DNA. Możliwość wiązania się Hfq do DNA została szczegółowo zbadana i udało się zaobserwować częściowe rozplatanie się podwójnej nici DNA bogatej w reszty adeniny oraz tyminy, które stymulowane było przez wiązanie się białka Hfq. Inne badania wykazały wspólny motyw sekwencji dla fragmentów DNA oczyszczonych razem z białkiem Hfq. Co ciekawe, stwierdzono również, iż w przypadku dużego stężenia Hfq, wiąże się ono niespecyficznie do DNA. Wydaje się również, iż takie wiązanie się Hfq wymaga specyficznej lokalnej architektury DNA. Właściwości te mogą wynikać z udziału białka Hfq w organizacji nukleoidu, co otwiera nową drogę do spekulacji na temat potencjalnej roli białka Hfq w regulacji replikacji DNA.

Ponieważ białko Hfq wpływa na wiele procesów komórkowych, efekty delecji genu kodującego to białko mają charakter plejotropowy. Dlatego, kolejne lata badań dostarczają wielu nowych informacji na temat tego wydawałoby się dobrze poznanego ryboregulatora.

Podziękowania

Sfinansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki, z grantu nr 2017/24/C/NZ1/00456 (GMC).

Piśmiennictwo

1. Aiba H.: Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 134–139 (2007)
2. Arluison V., Folichon M., Marco S., Derreumaux P., Pellegrini O., Seguin J., Hajnsdorf E., Regnier P.: The C-terminal domain of *Escherichia coli* Hfq increases the stability of the hexamer. Eur. *J. Biochem.* **271**, 1258–1265 (2004)
3. Arluison V., Mura C., Guzmán M.R., Liquier J., Pellegrini O., Gingery M., Régnier P., Marco S.: Three-dimensional structures of fibrillar Sm proteins: Hfq and other Sm-like proteins. *J. Mol. Biol.* **356**, 86–96 (2006)
4. Azam T.A., Ishihama A.: Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J. Biol. Chem.* **274**, 33105–33113 (1999)
5. Bardill J.P., Zhao X., Hammer B.K.: The *Vibrio cholerae* quorum sensing response is mediated by Hfq-dependent sRNA/mRNA base pairing interactions. *Mol. Microbiol.* **80**, 1381–1394 (2011)
6. Bi E.F., Lutkenhaus J.: FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, **354**, 161–4 (1991)

7. Brennan R.G., Link T.M.: Hfq structure, function and ligand binding. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 125–133 (2007)
8. Carmichael G.G., Weber K., Niveleau A., Wahba A.J.: The host factor required for RNA phage Q beta RNA replication *in vitro.* Intracellular location, quantitation, and purification by polyadenylate-cellulose chromatography. *J. Biol. Chem.* **250**, 3607–3612 (1975)
9. Cech G.M., Pakuła B., Kamrowska D., Wegrzyn G., Arluison V., Szalewska-Pałasz A.: Hfq protein deficiency in *Escherichia coli* affects ColE1-like but not lambda plasmid DNA replication. *Plasmid,* **73**, 10–15 (2014)
10. Chao Y., Vogel J.: The role of Hfq in bacterial pathogens.: *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 24–33 (2010)
11. Dame R.T., Noom M.C., Wuite G.J.L.: Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature*, **444**, 387–390 (2006)
12. de Haseth P. L., Uhlenbeck O. C.: Interaction of *Escherichia coli* host factor protein with oligoriboadenylates. *Biochemistry*, **19**, 6138–6146 (1980)
13. Diestra E., Cayrol B., Arluison V., Risco C.: Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the *hfq* protein close to the bacterial membrane. *Plos One,* **4**, (2009)
14. Fortas E., Piccirilli F., Malabirade A., Militello V., Trépout S., Marco S., Taghbalout A., Arluison V.: New insight into the structure and function of Hfq C-terminus. *Biosci. Rep.* **35**, 1–9 (2015)
15. Franze de Fernandez M.T., Hayward W.S., August J.T.: Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Pruification and properties of host factor I, a ribonucleic acid--binding protein. *J. Biol. Chem.* **247**, 824–831 (1972)
16. Geinguenaud F., Calandrini V., Teixeira J., Mayer C., Liquier J., Lavelle C., Arluison V.: Conformational transition of DNA bound to Hfq probed by infrared spectroscopy. *Phys. Chem.* **13**, 1222–1229 (2011)
17. Guillier M., Gottesman S., Storz G.: Modulating the outer membrane with small RNAs. *Gene. Dev.* **20**, 2338–2348 (2006)
18. Guisbert E., Rhodius V.A., Ahuja N., Witkin E., Gross C.A.: Hfq modulates the sigmaE-mediated envelope stress response and the sigma32-mediated cytoplasmic stress response in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **189**, 1963–1973 (2007)
19. Hermann H., Fabrizio P., Raker V.A., Foulaki K., Hornig H., Brahms H., Luhrmann R.: snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO J.* **14**, 2076–2088 (1995)
20. Holmqvist E., Wright P. R., Li L., Bischler T., Barquist L., Reinhardt R., Vogel J.: Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking *in vivo*. *EMBO J.* **35**(9), 991–1011. (2016)
21. Hori K., Yanazaki Y.: Nucleotide sequence specific interaction of host factor I with bacteriophage Q beta RNA. *FEBS Lett.* **43**, 20–22 (1974)
22. Ikeda Y., Yagi M., Morita T., Aiba H.: Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation of target mRNAs mediated by sRNAs in *Escherichia coli. Mol. Microbiol.* **79**, 419–432 (2011)
23. Jiang K., Zhang C., Guttula D., Liu F., van Kan J. A., Lavelle C., Kubiak K., Malabirade A., Lapp A., Arluison V., van der Maarel J.R.C.: Effects of Hfq on the conformation and compaction of DNA. *Nucleic Acids Res.* **43**, 4332–4341 (2015)
24. Kajitani M., Kato A., Wada A., Inokuchi Y., Ishihama A.: Regulation of the Escherichia coli *hfq* gene encoding the host factor for phage Q beta. *J. Bacteriol.* **176**, 531–534 (1994)
25. Link T.M., Valentin-Hansen P., Brennan R.G.: Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 19292–19297 (2009)
26. Lu F., Taghbalout A.: Membrane association via an amino-terminal amphipathic helix is required for the cellular organization and function of RNase II. *J. Biol. Chem.* **288**, 7241–7251 (2013)
27. Melamed S., Peer A., Faigenbaum-Romm R., Gatt Y.E., Reiss N., Bar A., Margalit, H.: Global Mapping of Small RNA-Target Interactions in Bacteria. *Molecular Cell*, **63**(5), 884–897 (2016)
28. Mohanty B.K., Maples V.F., Kushner S.R.: The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli. Mol. Microbiol.* **54**, 905–920 (2004)
29. Moll I., Afonyushkin T., Vytvytska O., Kaberdin V. R., Blasi U.: Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA,* **9**, 1308–1314 (2003)
30. Muffler A., Fischer D., Hengge-Aronis R.: The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for rpoS translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **10**, 1143–1151 (1996)
31. Mura C., Randolph P.S., Patterson J., Cozen A.E.: Archaeal and eukaryotic homologs of Hfq: A structural and evolutionary perspective on Sm function. *RNA Biol.* **10**, 636–651 (2013)
32. Ohniwa R.L., Muchaku H., Saito S., Wada C., Morikawa K.: Atomic force microscopy analysis of the role of major DNA--binding proteins in organization of the nucleoid in *Escherichia coli. Plos One,* **8**, e72954 (2013)
33. Olejniczak M.: Despite similar binding to the Hfq protein regulatory RNAs widely differ in their competition performance. *Biochemistry* **50**, 4427–4440 (2011)
34. Papenfort K., Vogel J.: Regulatory RNA in bacterial pathogens.: *Cell Host Microbe,* **8**, 116–127 (2010)
35. Paull T.T., Haykinson M.J., Johnson R.C.: The nonspecific DNA--binding and -bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures. *Genes Dev.* **7**, 1521–1534 (1993)
36. Ramos C.G., Sousa S.A., Grilo A.M., Feliciano J.R., Leitao J.H.: The second RNA chaperone, Hfq2, is also required for survival under stress and full virulence of *Burkholderia cenocepacia* J2315. *J. Bacteriol.* **193**, 1515–1526 (2011)
37. Rice J.B., Vanderpool C.K.: The small RNA SgrS controls sugar--phosphate accumulation by regulating multiple PTS genes. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3806–3819 (2011)
38. Ross J.A., Ellis M.J., Hossain S., Haniford D.B.: Hfq restructures RNA-IN and RNA-OUT and facilitates antisense pairing in the Tn10/IS10 system. *RNA,* **19**, 670–684 (2013)
39. Ross J.A., Trussler R.S., Black M.D., McLellan C.R., Haniford D.B.: Tn5 transposition in *Escherichia coli* is repressed by Hfq and activated by over-expression of the small non-coding RNA SgrS. *Mob. DNA,* **5**, 27 (2014)
40. Santiago-Frangos A., Jeliazkov J.R., Gray J.J., Woodson S.A.: Acidic C-terminal domains autoregulate the RNA chaperone Hfq. *eLife*, **6**, e27049 (2017)
41. Sauer E., Schmidt S., Weichenrieder O.: Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9396–9401 (2012)
42. Schu D.J., Zhang A., Gottesman S., Storz G.: Alternative Hfq--sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition. *EMBO J.* **34** (20), 2557–2573 (2015)
43. Senear A.W., Steitz J.A.: Site-specific interaction of Q beta host factor and ribosomal protein S1 with Q beta and R17 bacteriophage RNAs. *J. Biol. Chem.* **251**, 1902–1912 (1976)
44. Skoko D., Yan J., Johnson R.C., Marko J.F.: Low-force DNA condensation and discontinuous high-force decondensation reveal a loop-stabilizing function of the protein Fis. *Phys. Rev. Lett.* **95**, 208101 (2005)
45. Sonnenfield J.M., Burns C.M., Higgins C.F., Hinton J.C.: The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a gre-

ater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in *hns* mutants. *Biochimie*, **83**, 243–249 (2001)
46. Swinger K.K., Rice P.A.: IHF and HU: Flexible architects of bent DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 28–35 (2004)
47. Talukder A., Ishihama A.: Growth phase dependent changes in the structure and protein composition of nucleoid in *Escherichia coli*. *Sci. China Life Sci.* **58**, 902–911 (2015)
48. Tsui H.C., Feng G., Winkler M.E.: Negative regulation of mutS and mutH repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **179**, 7476–7487 (1997)
49. Tsui H.C., Leung H.C., Winkler M.E.: Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **13**, 35–49 (1994)
50. Udekwu K.I., Darfeuille F., Vogel J., Reimegård J., Holmqvist E., Wagner E.G.H.: Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Gene. Dev.* **19**, 2355–2366 (2005)
51. Updegrove T.B., Correia J.J., Galletto R., Bujalowski W., Wartell R.M.: *E. coli* DNA associated with isolated Hfq interacts with Hfq's distal surface and C-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta*, **1799**, 588–596 (2010)
52. Valentin-Hansen P., Eriksen M., Udesen C.: The bacterial Sm-like protein Hfq: A key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.* **51**, 1525–1533 (2004)
53. Vassilieva I.M., Nikulin A.D., Blasi U., Moll I., Garber M.B.: Crystallization of Hfq protein: a bacterial gene-expression regulator. Acta Crystallogr. D. *Biol. Crystallogr*. **59**, 1061–1063 (2003)
54. Vassilieva I.M., Rouzanov M.V, Zelinskaya N.V, Moll I., Blasi U., Garber M.B.: Cloning, purification, and crystallization of a bacterial gene expression regulator – Hfq protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **67**, 1293–1297 (2002)
55. Vaughan S., Wickstead B., Gull K., Addinall S.G.: Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J. Mol. Evol.* **58**, 19–29 (2004)
56. Vecerek B., Beich-Frandsen M., Resch A., Blasi U.: Translational activation of rpoS mRNA by the non-coding RNA DsrA and Hfq does not require ribosome binding. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1284–1293 (2010)
57. Vogel J., Luisi B.F.: Hfq and its constellation of RNA.: *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 578–589 (2011)
58. Vogt S.L., Raivio T.L.: Hfq reduces envelope stress by controlling expression of envelope-localized proteins and protein complexes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **92**, 681–697 (2014)
59. Vytvytska O., Jakobsen J.S., Balcunaite G., Andersen J.S., Baccarini M., von Gabain A.: Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli ompA* mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14118–14123 (1998)
60. Vytvytska O., Moll I., Kaberdin V.R., Von Gabain A., Bläsi U.: Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Gen. Dev.* **14**, 1109–1118 (2000)
61. Zhang A., Altuvia S., Tiwari A., Argaman L., Hengge-Aronis R., Storz G.: The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J*. **17**, 6061–6068 (1998)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 22–32
http://www.pm.microbiology.pl

PANDEMICZNE KORONAWIRUSY CZŁOWIEKA – CHARAKTERYSTYKA ORAZ PORÓWNANIE WYBRANYCH WŁAŚCIWOŚCI HCOV-SARS I HCOV-MERS

Katarzyna W. Pancer*

Zakład Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – PZH w Warszawie

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano w grudniu 2017 r.

Streszczenie: W XX w. opisano 2 koronawirusy wywołujące na ogół łagodne zakażenia dróg oddechowych u ludzi (HCoV-229E, HCoV-OC43). Koronawirusy szerzące się pandemicznie wykryto dopiero w XXI w. – w 2002 r. w Chinach SARS-HCoV – był przyczyną ciężkich zakażeń dolnych dróg oddechowych (SARS), oraz w 2012 r. MERS-HCoV – krążący głównie na Półwyspie Arabskim. Epidemia SARS zakończyła się w 2004 r. powodując zachorowanie >8000 osób i 774 zgony, natomiast epidemia MERS trwa nadal (>2000 chorych, >700 zgonów) choć jej intensywność zmalała. Aby doszło do zakażenia człowieka tymi wirusami konieczne było dwukrotne przełamanie bariery międzygatunkowej: dla wirusa HCoV-SARS – przeskok z nietoperzy na cywetę palmową a następnie na człowieka; dla wirusa HCoV-MERS – przeskok z nietoperzy na wielbłądy i na człowieka. Do zakażenia dochodzi najczęściej drogą kropelkową w przypadku bliskiego kontaktu (<1 m), ale oba wirusy nie tracą aktywności w postaci aerozolu powietrznego (do 24 godz.) i dlatego mogą się szerzyć także drogą powietrzną (wentylacja). Zdolność przekazywania zakażenia na drodze człowiek-człowiek znacznie mocniej utrwaliła się dla HCoV-SARS niż dla HCoV-MERS (odpowiednio: 8 generacji vs. 4). Wirusy te różnią się także: strukturą genomu i mechanizmami chorobotwórczości: inny receptor, mechanizm wnikania do komórki, inny sposób modulowania odpowiedzi gospodarza (np. hamowanie kaskady IFNβ). Prawdopodobnie różnice te wpływają na odmienny obraz zachorowania człowieka. W zakażeniu HCoV-MERS obserwuje się przypadki ARDS, zachorowania o łagodnym przebiegu oraz zakażenia bezobjawowe. Natomiast HCoV-SARS wykrywano tylko w przebiegu ciężkich zakażeń (SARS). W pracy porównano dane nt. struktury tych wirusów, mechanizmu „przeskoku międzygatunkowego" oraz zdolności do namnażania w organizmie człowieka, modulacji kaskady IFN typu I, wywoływanych objawów i szerzenia się zakażeń.

1. Wstęp. 2. Porównanie struktury. 3. Transmisja zakażenia. 3.1. Pochodzenie wirusów. 3.2. Bariera międzygatunkowa. 4. Występowanie zakażeń u ludzi. 5. Namnażanie wirusów w organizmie ludzkim. 5.1. Hamowanie kaskady interferonu. 6. Zachorowania wywołane przez koronawirusy SARS i MERS. 7. Ogniska zakażeń szpitalnych. 8. Podsumowanie

Pandemic *Human Coronavirus* – characterization and comparison of selected properties of HCoV-SARS and HCoV-MERS

Abstract: Two *Coronaviruses*, HCoV-229E and HCoV-OC43, causing generally mild respiratory tract infections in humans, were described in the XX c. Pandemic *Coronaviruses* were first discovered as late as in the XXI c.: SARS-HCoV in 2002 – causing severe respiratory tract infections (SARS) in China; MERS-HCoV in 2012 – circulating mostly on the Arabian Peninsula. The SARS epidemic ended in 2004 resulting in morbidity of >8000 and >770 deaths, while the MERS epidemic is still ongoing (>2000 ill, >700 deaths) although its intensity decreased. Both viruses are zoonotic and require at least two "host jumps" for the transmission of the infection to humans: for HCoV-SARS – from bat to palm civet and then to human; for HCoV-MERS – from bats to camels and subsequently to humans. Primary mode of transmission is droplet in close contact (<1 m), but both viruses remain active in aerosol (up to 24 h), so infection can be also spread by air (ventilation). The ability for human-to-human transmission is higher for HCoV-SARS than for HCoV-MERS (8 generations vs. 4, respectively). Moreover, there are differences in genome structure and pathogenic mechanisms: different receptor, cell entry mechanism, different way of host response modulation (e.g. inhibition of IFNβ cascade), etc. Probably, these differences influence the overall manifestation of the disease in humans. Infection caused by HCoV-MERS might manifest itself as ARDS, a mild-mannered and asymptomatic disease. HCoV-SARS infections seem to be associated with severe disease only. In this paper, a comparison of the structure of these viruses, the mechanisms underlying their ability to cross the interspecies barrier and to multiply in the human body, including modulation of IFNβ cascade, as well as routes of infection transmission and symptoms caused, were presented.

1. Background. 2. Comparison of structure. 3. Transmission of infections. 3.1. Origin of the viruses. 3.2. Interspecies transmission. 4. Infections in humans. 5. Growth of the viruses in the human body. 5.1. Inhibition of interferon cascade. 6. Infections due to MERS-HCoV and SARS-HCoV. 7. Hospital outbreaks. 8. Summary

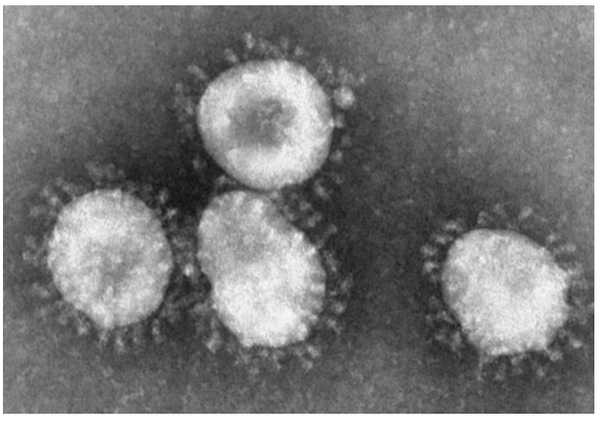
Słowa kluczowe: inhibicja kaskady interferonu, objawy zachorowania, międzygatunkowa bariera, struktura genomu, transmisja zakażeń
Key words: inhibition of interferon cascade, symptoms, interspecies transmission, structure of genome, transmission of infection

1. Wstęp

Koronawirusy są to osłonkowe wirusy, których genom stanowi jednoniciowe RNA o dodatniej polarności (+ssRNA). Nazwa pochodzi od korony słonecznej, którą przypominają dzięki obecności wypustek w obrazie mikroskopu elektronowego (ryc. 1).

Pierwsze znane koronowirusy wywołujące zakażenia dróg oddechowych u ludzi opisano w latach 60. XX wieku i były to HCoV-229E oraz HCoV-OC43. Zachorowania te mają na ogół łagodny przebieg i dlatego do 2002 r. uznawane były jako stanowiące niezbyt istotny problem z punktu widzenia zdrowia publicznego. Na początku 2002 r. w Chinach stwierdzono

* Autor korespondencyjny: Dr Katarzyna W. Pancer, Zakład Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – PZH w Warszawie, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 542 13 08; e-mail: kpancer@pzh.gov.pl



Ryc. 1. Obraz *HCoV-SARS* w mikroskopie elektronowym
Autor: Fred Murphy, materiały the Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), numer #4814.

występowanie licznych, ciężkich zakażeń dolnych dróg oddechowych, o nieznanej etiologii, szerzących się drogą kropelkową, których czynnikiem etiologicznym był koronawirus. Został on nazwany od jednostki chorobowej jaką wywoływał: koronawirus *Severe Acute Respiratory Syndrom* człowieka (SARS-HCoV). Ogółem, w okresie od 1 listopada 2002 r. do 31 lipca 2003 r. zgłoszono do WHO 8096 zachorowań na SARS oraz 774 zgony [27]. Dane sprzed 1 listopada 2012 r. nie są dostępne. W wyniku dalszych badań, wykryto kolejne koronawirusy wywołujące zakażenia człowieka: HCoV-NL63 (2004 r.) oraz HCoV-HKU1 (2005 r.). Oba te wirusy wywołują zakażenia dróg oddechowych, ale przeważnie o lżejszym lub asymptomatycznym przebiegu [1]. Jednak w 2012 r. ponownie stwierdzono epidemię ciężkiego zakażenia dróg oddechowych wywołaną przez koronawirusa, nazwanego MERS-HCoV (*Middle East Respiratory Syndrom Virus*). Nazwa pochodzi od regionu Bliskiego Wschodu, w którym stwierdzono epidemię. Zakażenie koronawirusem MERS może manifestować się w różny sposób, począwszy od ciężkich, przypominających SARS, objawów ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), poprzez zachorowania o lżejszym przebiegu, aż do zakażeń bezobjawowych. Do chwili obecnej epidemia MERS objęła 2030 osób w 27 krajach, w tym 748 osób zmarło [11]. Liczba nowych przypadków MERS pozostaje obecnie na stałym, niewielkim poziomie. Wydaje się, że jest to odpowiedni moment na podsumowanie i porównanie zarówno właściwości obu pandemicznych koronawirusów, jak i wywoływanych przez nie zachorowań.

2. Porównanie struktury

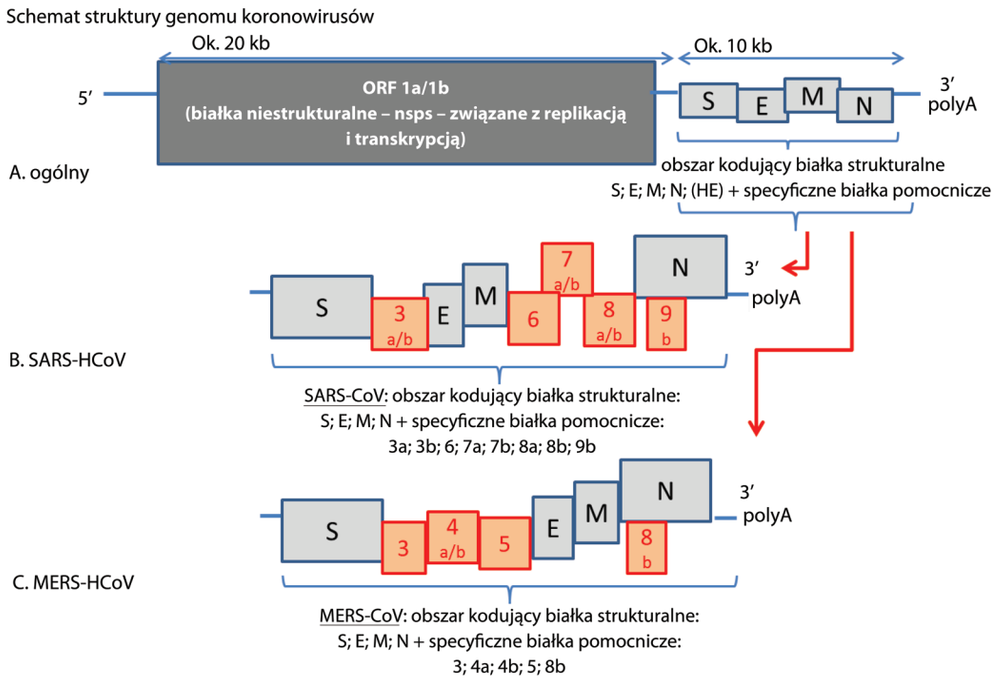
Oba wirusy, MERS-HCoV i SARS-HCoV, należą do rzędu *Nidovirus*, rodziny *Coronaviridae* oraz rodzaju *Betacoronavirus*, ale do dwóch linii: B (SARS-CoV) i C (MERS-CoV). Posiadają bardzo duży genom: ok. 31 kb, który stanowi jednoniciowe RNA o dodatniej polarności. Ponieważ koronawirusy posiadają na początku strukturę CAP to genom ten może być wykorzystywany w komórce gospodarza zarówno w procesie powielania genomowego RNA, jak i jako mRNA w procesie translacji i tworzenia białek itp. Część genomu odpowiadająca za procesy replikacji stanowi ok. 60% (ORF1a/1b), natomiast geny kodujące białka strukturalne zgromadzone są w części 3' razem z genami kodującymi białka pomocnicze (tzw. accessory proteins) (ryc. 2). Białka niestrukturalne biorą udział w procesie replikacji, niektóre z nich wykazują wpływ na odpowiedź gospodarza, a nsp1 i nsp2 uznawane są za czynniki zjadliwości niektórych koronawirusów. Podobnie jak u innych koronawirusów, białka strukturalne to: białko S (glikoproteina powierzchniowa), E (białko osłonkowe), M (membranowe), N (białko nukleocapsydu) [1, 26, 28]. Stwierdzono występowanie różnic w strukturze genomu pomiędzy wirusami SARS i MERS, szczególnie w części kodującej białka pomocnicze: w genomie MERS-CoV wyróżniono 5 genów kodujących białka pomocnicze, natomiast SARS-CoV – 8. Niektóre z białek pomocniczych odgrywają rolę w modyfikowaniu odpowiedzi gospodarza [26, 28].

3. Transmisja zakażenia koronawirusami SARS i MERS

3.1. Pochodzenie wirusów

Zarówno SARS-HCoV, jak i MERS-HCoV są zoonotycznymi wirusami, powodującymi zakażenia człowieka oraz zwierząt. Uważa się, że naturalnym rezerwuarem tych wirusów są nietoperze. Aby doszło do zakażenia człowieka wirusami SARS i MERS musiało najpierw dojść do przełamania bariery gatunkowej pomiędzy nietoperzami oraz innymi ssakami. Następnie konieczne było utrwalenie przekazywania zakażenia tymi wirusami wśród tych zwierząt, które w ten sposób stały się ogniwem pośrednim. Dopiero od nich zakażenie zostało przeniesione na ludzi. Tak więc konieczne było co najmniej 2-krotne przełamanie bariery międzygatunkowej, aby wirusy MERS i SARS stały się patogenne dla człowieka.

W łańcuchu transmisji zakażenia wirusem SARS istotną rolę odegrał łuskun palmowy (cyweta palmowa), niewielkie łaszowate zwierzę, które stanowi przysmak kuchni chińskiej. Uważa się, że pierwotnym miejscem zakażania się ludzi od cywety palmowej były targowiska. Innym pośrednim gospodarzem koronowirusa SARS był jenot azjatycki. Do zakażenia najprawdopodobniej dochodzi na drodze kropelkowej. Dość szybko utrwaliła się zdolność transmisji zakażenia wirusem SARS na drodze człowiek-człowiek [8,18].



Ryc. 2. Porównanie struktury genomu koronawirusów: SARS-CoV i MERS-CoV

Objaśnienia: A – ogólny schemat struktury koronawirusów; B – fragment genomu *SARS-HCoV*; C – fragment genomu *MERS-HCoV*. Białka strukturalne: S – glikoproteina S (białko Spike); E – osłonkowe, N – białko nukleokapsydu, M – białko membranowe, białka pomocnicze: białko 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9. Na podstawie [1, 26, 28].

W przypadku koronawirusa MERS pośrednim gospodarzem są wielbłądy. Badania seroepidemiczne wykazały, że wirus podobny do MERS-HCoV od lat powoduje zakażenia i zachorowania wielbłądów, szczególnie na Półwyspie Arabskim i w Afryce. W badaniach prowadzonych w latach 2014–2015 w Arabii Saudyjskiej wykazano jednoczesną cyrkulację co najmniej 3 różnych koronawirusów wśród wielbłądów. Spośród zbadanych 1309 wielbłądów u 25,3% wykryto zakażenie koronawirusem i były to wirusy: MERS-CoV (zaliczany do betakoronawirusów, grupy C), betacoronawirus 1 (zaliczany do betakoronawirusów, grupy A), koronawirus człowieka HCoV-229E (zaliczany do alfakoronawirusów), koronawirus wielbłąda β1-HKU23-CoV oraz czapli α-CoV. Najczęściej stwierdzano zakażenia wirusem MERS (12,1%) oraz wykrywano wirusa czapli α-CoV (19,8%), często jako współzakażenia, ale nie wykazano zjawiska rekombinacji pomiędzy tymi wirusami [24]. Niektóre badania sugerują, że tzw. „przeskok wirusa" pomiędzy nietoperzami a wielbłądami nastąpił ok. 20 lat temu. Ponieważ w wyniku zakażenia wytwarzana jest trwała odporność to chorują głównie młode zwierzęta. RNA wirusa stwierdzono także w niepasteryzowanych produktach, takich jak sery, mleko wielbłądzie itp., co sugeruje możliwość wystąpienia zakażenia na drodze pokarmowej [18]. W procesie pasteryzacji produktów mlecznych dochodzi do całkowitej inaktywacji wirusa. Do zakażenia człowieka może także dojść w wyniku kontaktu z wydalinami zakażonego wielbłąda (z dróg oddechowych, mocz, kał itp.), a także podczas obróbki mięsa i wyrobów z wielbłąda [18, 21].

Koronawirus MERS wykazuje dość znaczną odporność na warunki środowiska: w mleku przechowywanym w temperaturze +4°C zachowywał zakaźność do 72 godzin, natomiast w temperaturze 22°C – 48 godzin. W postaci aerozolu w warunkach niskiej wilgotności względnej (20–30%) oraz temperatury 30°C wirus zachowywał zakaźność przez 24 godziny. Dla porównania wirus grypy typu A przeżywa w takich warunkach 6-krotnie krócej (maksymalnie 4 godziny) [9, 21]. Zdolność do przeżycia wirusa SARS w postaci aerozolu jest jeszcze wyższa niż wirusa MERS, ale ze względu na wysokie zagrożenie dla ludzi, możliwość prowadzenia takich badań jest znacznie ograniczona [28].

Ze względu na wysoką odporność koronawirusów na warunki środowiska i zdolność do zachowywania zakaźności w postaci aerozolu, uważa się, że istotną drogą szerzenia się zakażeń między ludźmi jest także droga powietrzna. W analizie ryzyka należy więc uwzględniać procesy powodujące powstanie skażonego wirusami aerozolu nawet takie jak kaszel, oddawanie moczu, dojenie wielbłądów itp.

3.2. Bariera międzygatunkowa

Zjawisko przełamania bariery międzygatunkowej wiąże się przede wszystkim ze zmianami w obrębie glikoproteiny S (Spike Glycoprotein), znajdującej się

na powierzchni koronawirusa. Glikoproteina S składa się z podjednostki N-terminalnej – S1 oraz S2-na końcu C – zakotwiczonej w błonie. Podjednostka S1 odpowiada za rozpoznanie receptorów gospodarza i charakteryzuje się znaczną zmiennością. Podjednostka S1 składa się z 2 domen (N i C) i to domena C-terminalna stanowi najczęściej domenę wiążącą receptor (Receptor-Binding Domain, RBD). W przypadku gdy domena C-terminalna wiąże się z receptorem komórki, wówczas domena N-terminalna (NTD) bierze udział w początkowym wiązaniu, dzięki rozpoznawaniu specyficznych cukrowych cząsteczek. Podsumowując, podjednostka S1 odpowiada w znacznej mierze za tropizm gatunkowy i tkankowy koronawirusów. Opisana struktura i funkcja podjednostki S1 jest charakterystyczna dla większości koronawirusów, wyjątkiem jest np. wirus MHV (*Murine Hepatitis Virus*) [18].

Innym czynnikiem mającym istotny wpływ na gatunkowe ograniczenie zakażenia koronawirusami jest zdolność do uwolnienia podjednostki S2 od związanej z receptorami podjednostki S1. Podjednostka S2 oraz powstające peptydy fuzyjne odpowiadają za fuzję międzybłonową wirusa i komórki. Ich uwolnienie możliwe jest jedynie dzięki aktywności enzymów komórkowych, tak więc czynnikiem odpowiadającym za tropizm gatunkowy i tkankowy, jest w tym wypadku, profil enzymów występujących w komórce gospodarza [13, 18].

SARS-CoV

Glikoproteina S wirusa SARS składa się z 1255 aminokwasów. Uważa się, że cięcie enzymatyczne i podział na 2 podjednostki S1 i S2 możliwe jest dzięki aktywności trypsyny pomiędzy R667 a S668 lub aktywności katepsyny L – między T678 a M679. Podobnie jak u większości koronawirusów, domeną wiążącą receptor (Receptor-Binding Domain, RBD) jest domena C-terminalna S1. Wiąże się ona z receptorem błonowym typu I – ACE2 (konwertaza angiotensyny 2). Następnie dochodzi do fuzji między błonami wirusa i komórki dzięki aktywności S2 oraz powstającymi cząsteczkami nazywanymi peptydami fuzyjnymi: fusion peptide (FP), internal fusion peptide (IFP), transmembrane domain (PTM). Stwierdzono niewielką zmienność aminokwasową FP, IFP i PTM co sugeruje ich istotną rolę w procesie fuzji i wnikania wirusa do komórki. Niestety do tej pory ich funkcja nie została w pełni poznana. Proces „enzymatycznej obróbki" glikoproteiny S wirusa SARS rozpoczyna się od działania komórkowych proteaz takich jak: katepsyna L (proces endocytozy) oraz trypsyna, termolizyna i elastaza, które biorą udział w tworzeniu syncytii komórkowych. Ponadto stwierdzono, że w procesie wnikania SARS do komórek człowieka prawdopodobnie mogą brać udział proteazy TMPRSS2, TMPRSS11a i HAT znajdujące się w błonach komórek w drogach oddechowych człowieka. Należy zaznaczyć, że białko Spike (glikoproteina S) wirusa SARS nie posiada miejsca cięcia dla furyny i dlatego nie podlega obróbce zaraz po procesie biosyntezy. Białko S wirusa SARS różni się od glikoproteiny S koronawirusa zakażającego nietoperze (SL-CoV) przede wszystkim delecją aminokwasów w regionie rozpoznającym receptor (RBD). Delecja ta powoduje niezdolność do oddziaływania wirusa SL-CoV z receptorem ACE2 człowieka i zakażania go. Porównanie sekwencji aminokwasowej białka S wirusów HCoV-SARS oraz koronawirusa cywety palmowej wykazuje obecność 6 podstawień. Uważa się, że kluczowymi dla adaptacji do ludzkiego ACE2 są zmiany K479N oraz S487T. W wyniku porównania zdolności interakcji glikoproteiny S wirusa SARS z receptorami ACE2 różnych gatunków ssaków, stwierdzono zbliżony poziom oddziaływania wirusa SARS z ACE2 człowieka oraz cywety palmowej i jenota. Natomiast znacznie niższą zdolnością do wiązania wirusa SARS charakteryzuje się ACE2 myszy oraz szczura. Związane jest to z innymi, kolejnymi różnicami w strukturze aminokwasowej ACE2 pomiędzy człowiekiem a myszą, szczurem i innymi gatunkami ssaków. Jednak liczba mutacji nie zawsze dokładnie odpowiada stopniowi zdolności do wywołania zakażenia wirusem SARS. U cywety palmowej oraz jenota liczba mutacji wynosi ≥ 7, natomiast u rezusa, pazurczatki, chomika, kota – ≤ 4. Plastyczność rozpoznawania receptora przez białko S ograniczona jest raczej przez rodzaj zmian (zmiany przestrzenne) niż przez ich liczbę [18].

W wyniku porównawczych analiz stwierdzono, że struktura ACE2 umożliwia rozpoznanie przez wirusa SARS i wywołanie zakażenia w komórkach następujących gatunków zwierząt: kotawca zielonosiwego (African Green monkey), rezusów, pazurczatki, chomika, kota, cywety palmowej, jenota, fretki i myszy [13, 18].

MERS-CoV

Białko S koronawirusa MERS składa się z 1353 aminokwasów. W domenie C-terminalnej, odpowiadającej, podobnie jak u SARS, za wiązanie receptora, wyróżniono fragment ok. 240 aminokwasów (tzw. domena wiążącą receptor, RBD), który jednak rozpoznaje inny receptor typu I: CD26 (dipeptydylopeptydaza 4, DPP4). W procesie wiązania bierze także udział szereg powierzchniowych grup funkcyjnych oddziaływujących z rozpuszczalnikiem w domenie wiążącej receptor (RBD). Podobne zjawisko obserwowano u niektórych *Alphacoronavirus*. Ponadto zaobserwowano interakcję między CD26 a ADA (deaminaza adenozyny), co może mieć istotne znaczenie przy stymulacji aktywacji układu immunologicznego [13, 18, 21].

Uważa się, że mechanizm wnikania wirusa MERS do komórki różni się od mechanizmu wnikania wirusa SARS i jest procesem dwustopniowym. W pierwszym etapie dochodzi do podziału białka S MERS-CoV na

podjednostki S1 i S2 w wyniku aktywności furyny – jeszcze w komórkach na etapie sekrecji białka S w retikulum endoplazmatycznym. Zidentyfikowano 2 miejsca cięcia furyny: R751/S752 oraz w podjednostce S2 – R887/S888. Uważa się, że cięcie podjednostki S2 jest warunkiem II etapu czyli stanowi miejsce wewnątrzkomórkowej fuzji. Stwierdzono także, że w tzw. „obróbce" białka S mogą brać udział takie proteazy komórkowe jak TMPRSS2, TMPRSS4, katepsyna B lub L i trypsyna. Podobnie jak u koronawirusa SARS, konieczne jest działanie enzymów komórkowych, ale możliwych jest wiele dróg ich aktywacji [18].

Stwierdzono, że zakażeniu wirusem MERS mogą ulegać komórki rezusa, pazurczatki, kozy, królika, konia, świni, cywety, wielbłąda – ale nie myszy, szczura, chomika i fretki. Kluczowym okazał się fragment 13 aminokwasów w receptorze, który musi być identyczny lub z prawie identyczny (dopuszczalne są 1 lub 2 zmiany). Większa liczba (≥ 5) zmian powodowała brak permisywności dla wirusa MERS. Proces obróbki przez komórkowe enzymy także odgrywa kluczową rolę w procesie wnikania wirusa MERS do komórki. Zmiany w sekwencji kluczowego fragmentu receptora są takie same u kozy, jak u owcy i krowy, ale komórki tych 2 ostatnich nie są podatne na zakażenie wirusem MERS [18].

Obecnie niewiele wiadomo na temat zmian adaptacyjnych w białku S wirusa MERS umożliwiających przeskok międzygatunkowy. Stwierdzono wysoki stopień konserwatywności fragmentu RBD. Najistotniejszym miejscem zmiany wydaje się L506F, choć może to być bardziej wynikiem presji układu immunologicznego gospodarza niż zmian w celu zwiększonej zdolności wiązania ludzkiego CD26 [18].

4. Występowanie zakażeń u ludzi

SARS

Epidemia zachorowań SARS występowała ogółem w 29 krajach/terytoriach (w tym w 2 autonomicznych obszarach Hong Kong i Makao) w latach 2002–2003 r. W okresie od 1 listopada 2002 r. do 31 lipca 2003 r. zgłoszono do WHO ogółem 8096 przypadków. Liczba ta nie odzwierciedla w pełni wielkości epidemii SARS. Jedną z przyczyn jest brak dostępu do informacji nt. zachorowań w pierwszym okresie epidemii, które występowały w Chinach na początku 2002 r. Wówczas, w związku ze spodziewanym (przewidywanym przez wielu badaczy) pojawieniem się nowego epidemicznego szczepu wirusa grypy, zachorowania rozpoznawano jako „prawdopodobnie" grypę. Dopiero identyfikacja czynnika zakaźnego jako koronawirusa oraz ujednolicenie definicji przypadku SARS umożliwiło rejestrację tych zakażeń przez WHO [27]. Jednak niedostateczne dane kliniczne lub laboratoryjne spowodowały wykluczenie wielu, pierwotnie uznanych za SARS, przypadków, szczególnie tych które miały miejsce w 2002 r. Przykładem może być wykluczenie 325 spośród 671 zgłoszonych ogółem na Tajwanie zachorowań. Należy podkreślić, że zakażenia SARS szybko szerzyły się wśród ludzi i były przyczyną licznych zgonów [25]. Wirus SARS, wg danych WHO, spowodował śmierć 774 osób, co stanowi 9,6% zakażonych. Mimo, że zachorowania SARS wykryto na terenie 29 krajów/terytoriach to większość spośród zgłoszonych do WHO obserwowana była w Chinach – 87,7% (w tym w Hong Kongu 21,7%). W innych krajach zachorowania zgłoszone były w znacznie niższej liczbie: Tajwan – 346 przypadków (4,3%), Kanada – 251 (3%), Singapur – 238 (3%), Wietnam – 63 (0,8%) i USA – 27 (0,3%). W Europie zgłoszono ogółem 34 zachorowania SARS w tym: w Niemczech (9), Francji (7), Szwecji (5), Włoszech (4), Wielkiej Brytanii (4) oraz po jednym przypadku w Hiszpanii, Irlandii, Rumunii, Rosji i Szwajcarii [11, 27].

Na podstawie analiz szerzenia się zakażeń wraz z podróżującymi osobami po całym świecie uznano, że ryzyko zawleczenia i rozprzestrzeniania zakażeń SARS jest wysokie. Przykładem może być Kanada, w której wystąpiło, najliczniejsze poza Azją, ognisko SARS – zachorowanie potwierdzono łącznie u 251 osób, w tym tylko 5 stanowiły przypadki importowane. W kraju tym 43 osoby zmarły w wyniku zakażenia SARS-CoV. Jedną z przyczyn wystąpienia tego ogniska SARS było zlekceważenie przez pacjenta zaleceń kwarantanny i konieczności zgłoszenia się do lekarza [14, 23, 25].

MERS

Pierwsze zakażenia koronawirusem MERS wykryto we wrześniu 2012 r. u 9 pacjentów pochodzących z Arabii Saudyjskiej, Kataru i Jordanii, u których stwierdzono ciężkie zapalenie dolnych dróg oddechowych. Retrospektywne badania zachowanych próbek materiału klinicznego wykazały, że pierwsze takie zakażenia wystąpiły w marcu 2012 r. W okresie 5 lat (od III.2012 r. do III.2017 r.) zidentyfikowano zakażenia wirusem MERS u 1956 osób, z tego 748 zmarło (38,2%) [11]. Zachorowania obserwowane są w 27 krajach na całym świecie, ale w ponad 80% występują na Bliskim Wschodzie, szczególnie w Arabii Saudyjskiej, Zjednoczonych Emiratach Arabskich, Jordanii, Katarze, Omanie. Drugie duże ognisko MERS wystąpiło w maju 2015 r. w Korei Południowej i spowodowane było zawleczeniem zakażenia z Bliskiego Wschodu. W wyniku pojedynczego zawleczenia MERS do Korei Południowej zachorowało 185 osób i było to największe do tej pory opisane szpitalne ognisko MERS [11, 20].

W Europie zakażenia wirusem MERS wykryto w Wielkiej Brytanii (4, importowane i lokalne), Niemczech (3 import.), Holandii (2 import.), Francji (2, import. i lokalne), we Włoszech (1 import.) oraz w Grecji (1 import.). Ogółem do tej pory w Europie zgłoszono

13 przypadków MERS i ryzyko zawleczenia tego zakażenia na nasz kontynent określane jest jako niskie. Poza Europą i Bliskim Wschodem zakażenia koronawirusem MERS zostały zawleczone do USA (2), Turcji (1), Tunezji (3, import. i lokalne), Tajlandii (3), Filipin (3) oraz Algierii, Egiptu, Chin i Malezji (po 1 importowanym przypadku) [11].

5. Namnażanie wirusów w organizmie ludzkim

Do transmisji zakażenia wirusem MERS i SARS między ludźmi dochodzi w wyniku bliskiego kontaktu (< 1 m): drogą kropelkową i kontaktu bezpośredniego. Istotne znaczenie ma także transmisja poprzez kontakt pośredni czyli poprzez skażone przedmioty. Stwierdzono dość znaczny udział drogi fekalno-oralnej w szerzeniu się zakażeń, szczególnie wirusem SARS. Ze względu na przeżywanie obu wirusów w warunkach niskiej wilgotności (co najmniej 24 godziny) zakażenia tymi wirusami mogą szerzyć się poprzez skażony aerozol powietrzny np. poprzez system wentylacji. Za czynnik ryzyka zakażenia wirusem SARS przyjmuje się m.in. podróż samolotem z osobą zakażoną tym koronawirusem [25]. Nie należy zapominać także o możliwości zakażenia wirusem MERS poprzez skażone niepasteryzowane produkty żywnościowe oraz kontakt z chorym zwierzęciem [18].

Pierwotnie, w związku z ograniczonym, w porównaniu do SARS, szerzeniem się zakażeń wirusem MERS, wysunięto hipotezę, że chory z SARS wydala więcej aktywnych cząstek wirusowych np. z kałem niż chory z MERS [7, 16]. Hipoteza ta nie znalazła potwierdzenia ani nie została odrzucona – nadal trwają badania. Jednak wykazano, że wirus MERS namnaża się w tkankach oskrzeli i płuc szybciej i w większym stopniu niż wirus SARS. Znamienny przyrost miana wirusa MERS obserwowany jest już po 24 godzinach, natomiast SARS – po 48 godzinach od zakażenia. Oba te wirusy namnażają się także w komórkach śródbłonka nerki, jelita i innych zawierających odpowiednie receptory [5, 16, 21].

Zdolność do namnażania się wirusa SARS i MERS w płucach, nerkach, jelitach itp. w istotny sposób wpływa na szerzenie się tych zakażeń oraz dobór materiałów do badań diagnostycznych. Należy jednak pamiętać, że namnażanie i wydalanie wirusa zależy od wielu czynników, w tym od indywidualnych właściwości chorego.

W wyniku prowadzonych analiz przypadków zakażeń wirusem MERS [3, 7, 8, 10, 21] można stwierdzić, że: najwyższy odsetek próbek dodatnich stwierdzano gdy poszukiwano wirusa MERS w próbkach pobranych z dolnych dróg oddechowych (ok. 90%). Badania Corman i wsp. [7] wskazują, że także w tych próbkach wykrywano najwyższe miano wirusa (średnio 5×10^6/ml, maksymalnie 6×10^{10}/ml), szczególnie w okresie 4–8 dni od rozpoznania zakażenia MERS/ wystąpienia objawów[1]. Wirus MERS długo utrzymuje się w dolnych drogach oddechowych, wykrywano go nawet 30 dni od momentu rozpoznania zakażenia.

Znacznie niższy odsetek wyników dodatnich w zakażeniach wirusem MERS stwierdzano, gdy badano próbki z górnych dróg oddechowych (ok. 40–47%). Wirusa wykrywano najczęściej do 10 dnia od rozpoznania zakażenia wirusem MERS, ale u niektórych pacjentów – nawet 22 dnia. Stężenie wirusa w próbkach z górnych dróg oddechowych było dość wysokie – średnio 2×10^4/ml, maks. 4×10^6/ml;

Jedynie ok. 30% próbek surowicy krwi pacjentów zawierało genom wirusa MERS na wykrywalnym poziomie. Najwyższe prawdopodobieństwo wykrycia wirusa MERS we krwi było do 10 dnia od rozpoznania, natomiast u niektórych pacjentów dodatni wynik testu rt-PCR uzyskiwano jeszcze 15–22 dnia. Stężenie wirusa MERS w surowicy wynosiło: średnio $2{,}5 \times 10^3$/ml, maks. $2{,}5 \times 10^5$/ml;

Wirusa MERS wykryto w nielicznych próbkach kału (ok. 14%) i to najczęściej pobranych w pierwszych dniach od rozpoznania (do 10 dnia), jednak wówczas stężenie wirusa było wysokie (średnio $1{,}5 \times 10^4$/ml, maks.$1{,}2 \times 10^5$/ml). W niektórych przypadkach wykrywano genom wirusa także 15–22 dnia od wystąpienia pierwszych objawów;

W moczu genom wirusa MERS wykrywano stosunkowo rzadko (ok. 2–4%) i najczęściej w pierwszym okresie od momentu rozpoznania zakażenia. Opisano także przypadek, w którym dodatni wynik moczu uzyskano 30 dnia od zachorowania. Poziom wirusa nie był zbyt wysoki i wynosił średnio $1{,}2 \times 10^2$/ml, maks. 5×10^2/ml.

Wirusa MERS wykrywano także w wymazach z oka choć były to sporadyczne badania. Stężenie wirusa było bardzo różne i wynosiło średnio $1{,}5 \times 10^2$/ml, maks. $1{,}5 \times 10^5$/ml;

Mniej jest wiadomo na temat namnażania w organizmie człowieka i wydalania wirusa SARS. Ze względu na wysoki potencjał pandemiczny wirusa SARS został on zaklasyfikowany jako patogen III kategorii bezpieczeństwa biologicznego (tzw. BSL3) i wszystkie badania z żywym wirusem muszą być prowadzone w warunkach BSL3 lub BSL4. Ze względów bezpieczeństwa nie zaleca się pobierania próbek z dolnych dróg oddechowych. Dla celów diagnostycznych wystarcza badanie próbek krwi pobranych we wczesnym etapie choroby lub próbek kału – także w późniejszym etapie choroby. Stwierdzono, że genom wirusa SARS wykrywano w 79% próbek krwi pobranych w pierwszym tygodniu od wystąpienia pierwszych objawów oraz w 50% próbek pobranych w drugim tygodniu. Wykazano, że

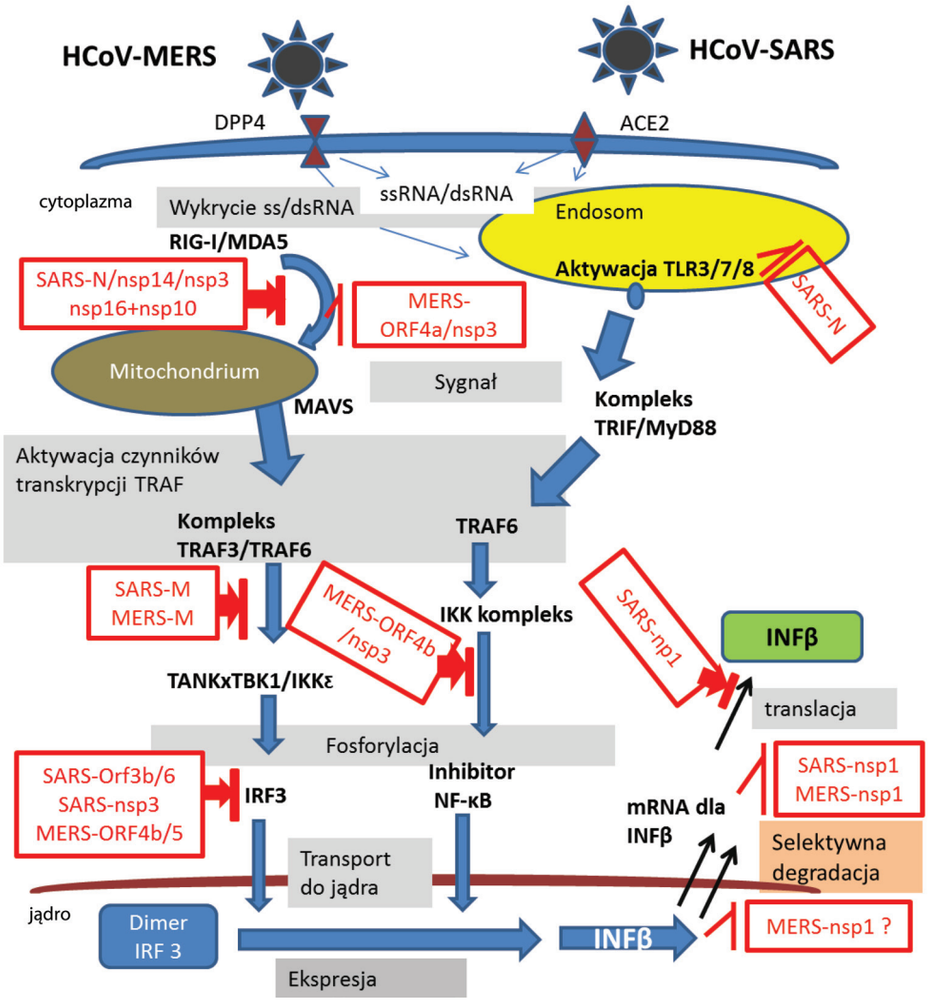
[1] Ze względu na brak specyficznych objawów nie zawsze możliwe jest ustalenie daty wystąpienia pierwszych objawów

wirus SARS namnaża się także (w niewielkim stopniu) w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, makrofagach oraz komórkach dendrytycznych. Innym materiałem klinicznym polecanym do badania w podejrzeniu SARS jest próbka kału (lub wymaz z odbytu), ponieważ poziom wirusa SARS w próbkach kału jest na tyle wysoki, że uznano to badanie za wystarczająco czułe i wiarygodne [8, 12, 14, 15].

5.1. Hamowanie kaskady interferonu

Jednym z podstawowych mechanizmów obrony organizmu ludzkiego przed namnażaniem się wirusa jest wykrycie jego obecności i aktywacja systemu odpornościowego, włączając w to wytwarzanie IFN typu I oraz cytokin. Do tej pory zidentyfikowano lub prawdopodobnie rozpoznano szereg białek/glikoprotein wirusa MERS i SARS wykazujących aktywność hamowania wobec poszczególnych elementów aktywacji kaskady interferonu, w tym IFNβ (ryc. 3), zarówno na drodze szlaku TLR, jak i RIG-/MDA5. Dotychczasowe badania wskazują na występowanie wielu różnic między mechanizmami hamowania procesu aktywacji kaskady IFNβ przez białka wirusów MERS i SARS. Stwierdzono, że białko M obu wirusów hamuje wytwarzanie IFN poprzez utrudnianie tworzenia kompleksu TRAF3xTANKxTBK1/IKKε, choć nie hamuje jego aktywności katalitycznej. Prawdopodobnie mechanizm działania jest podobny w przypadku białka M wirusa SARS i MERS, choć efekt działania białka M wirusa MERS jest słabszy niż wirusa SARS [13, 19, 26].

W procesie hamowania kaskady interferonu I typu biorą udział także białka pomocnicze. Ich działanie polega zarówno na modyfikacji sygnałów kaskady IFN, jak i hamowania wytwarzania IFN. Białka ORF3b i ORF6 wirusa SARS hamują wytwarzanie IFNβ poprzez zakłócenie aktywacji IRF3 (Interferon Regulatory Factor3), a także poprzez supresję aktywacji przez IFNβ czynników odpowiedzi (ISRE, Interferon Stimulated Response Element) w obszarze promotora genów stymulowanych przez interferon (Interferon Stimulated Genes, ISG). Ponadto ORF6 wirusa SARS hamuje



Ryc. 3. Schemat oddziaływania koronawirusów SARS i MERS na aktywację kaskady interferonu β (INF-β)
Według [26], zmodyfikowany. Opisy w tekście.

translokację STAT1 niezbędną w procesie aktywacji ISRE [26]. Dotychczasowe badania wskazują, że 3 białka pomocnicze wirusa MERS, ORF4a, ORF4b i ORF5, wykazują aktywność hamującą kaskadę IFN. Stwierdzono, że blokują translokację IRF3 do jądra, która jest niezbędna do aktywacji promotora IFN. Ponadto ORF4a wpływa ujemnie na aktywację NF-κB, oraz prawdopodobnie uniemożliwia wiązanie RNA wirusowego z RIG-I/MDA5 [26]. Badania nad poznaniem mechanizmu działania ORF4a i innych białek pomocniczych nadal trwają.

Białka niestrukturalne koronawirusów wykazują niski poziom zmian co wskazuje na ich funkcjonalne znaczenie dla namnażania wirusów. Białko niestrukturalne nsp1 wirusa SARS oraz MERS powoduje selektywną degradację mRNA gospodarza, ale z wykorzystaniem innego mechanizmu. Białko nsp1 obu wirusów wykazuje podwójną aktywność: aktywacji procesu cięcia mRNA oraz hamowania procesu translacji mRNA gospodarza. Jednak białko nsp1 wirusa SARS hamuje translację mRNA gospodarza w cytoplazmie – poprzez wiązanie się z podjednostką 40S rybosomu. Natomiast białko nsp1 wirusa MERS wykazuje aktywność zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie i nie wiąże się (lub tylko czasowo) z podjednostką 40S rybosomu. To wskazuje na inny mechanizm działania białka nsp1 wirusa MERS niż SARS-CoV [17, 26].

6. Zachorowania wywołane przez koronawirusy SARS i MERS

Okres inkubacji zakażenia tymi pandemicznymi koronawirusami jest podobny, choć nieco dłuższy w przypadku HCoV-MERS i wynosi 2–15 dni, najczęściej 5,2 dnia. Natomiast okres inkubacji SARS mieści się w zakresie 2–14 dni, najczęściej 4,6 dnia [3, 21, 28]. Objawy zachorowania wywołanego przez wirusy SARS i MERS są zbliżone i są to najczęściej: gorączka powyżej 38°C, nieproduktywny kaszel, ból gardła, dreszcze, krótki oddech, ból mięśni, duszność, niekiedy także palpitacje, biegunka, wymioty. Mimo, że kaszel jest częstym objawem w zakażeniu zarówno SARS-HCoV jak i MERS-HCoV, to krwioplucie znacznie częściej obserwowane jest u chorych zakażonych wirusem MERS. Ponadto u około połowy pacjentów z ciężkim przebiegiem MERS dochodzi do uszkodzenia nerek (tab. I). Należy jednak zwrócić uwagę, że u ok. połowy pacjentów z SARS stwierdzano podwyższone wartości kreatyniny, co może wskazywać na toczące się procesy chorobowe. Nie można także wykluczyć, że uszkodzenia nerek w przebiegu MERS związane są z innymi obciążeniami chorego. W zakażeniu SARS obserwuje się zapalenie płuc prowadzące do niewydolności oddechowej (Acute Respiratory Distress Syndrom, ARDS) o typowym dla zakażeń wirusowych – dwufazowym przebiegu. U ok. 20% pacjentów konieczne jest zastosowanie sztucznej wentylacji. Nie obserwowano bezobjawowych zakażeń wirusem SARS, natomiast zakażenia wirusem MERS mogą przebiegać w różny sposób: od bezobjawowego, poprzez zakażenie dolnych dróg oddechowych o łagodnym przebiegu, aż do ARDS. Stwierdzono znacznie częściej konieczność dodatkowego wentylowania chorych zakażonych MERS-HCoV z objawami zajęcia dolnych dróg oddechowych niż w wyniku zakażenia SARS-HCoV [2, 3, 12, 15, 20, 23].

Śmiertelność w przebiegu zakażenia wirusem SARS jest niższa niż w zakażeniu wirusem MERS (9,6% vs. 38%) [11, 27]. Może to być związane z częściej obserwowanymi zakażeniami MERS niż SARS u osób z innymi obciążeniami np. z chorobami serca, w podeszłym wieku, z chorobami metabolicznymi itp. Okres jaki upływał od wystąpienia pierwszych objawów do śmierci chorego także jest znacznie krótszy w zakażeniach MERS niż SARS (12 dni vs. 21 dni), co może być związane z dodatkowymi obciążeniami chorego, ale także z odmiennym mechanizmem patogenności. Czynnikami ryzyka są w obu przypadkach: wiek powyżej 65 r.ż., choroby metaboliczne (cukrzyca i in.), choroby serca i płuc, immunosupresja [2, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 20, 28]. Analiza przypadków zakażeń koronawirusem MERS wykazała także, że częściej obserwowano zgon u osób, u których okres inkubacji choroby wynosił < 5 dni (CFR[2] = 70), stwierdzano podwyższoną temperaturę ciała (pow. 38°C) (CFR = 55), duszność (CFR = 80) i kaszel z odkrztuszaniem (CFR = 100) [22]. Ponadto uważa się, zakażenia wirusem MERS częściej występują u mężczyzn, ale może to wynikać z miejscowych zwyczajów, bowiem w krajach arabskich to mężczyźni zajmują się hodowlą wielbłądów. Najczęściej na MERS chorują mężczyźni w wieku powyżej 65 r.ż. oraz młode kobiety (20–40 lat). Są to najczęściej pielęgniarki zajmujące się chorymi [11]. W tabeli I przedstawiono charakterystykę pacjentów, u których stwierdzono zachorowanie wywołane przez wirusy SARS lub MERS.

7. Ogniska zakażeń szpitalnych

Analiza danych dotyczących zakażeń wtórnych (tzw. secondary case) w ogniskach MERS i SARS wskazuje na istotne różnice w szerzeniu się tych zakażeń. Analiza ognisk zakażeń szpitalnych wywołanych przez wirusy SARS i MERS wskazuje, że zakażenia wtórne wirusem SARS występują znacznie częściej i szerzej – w dalszych generacjach. W tych dobrze epidemicznie opracowanych ogniskach nie stwierdzono szerzenia się zakażeń

[2] CFR = współczynnik umieralności, case fatality rate (%) = (n/N) × 100.

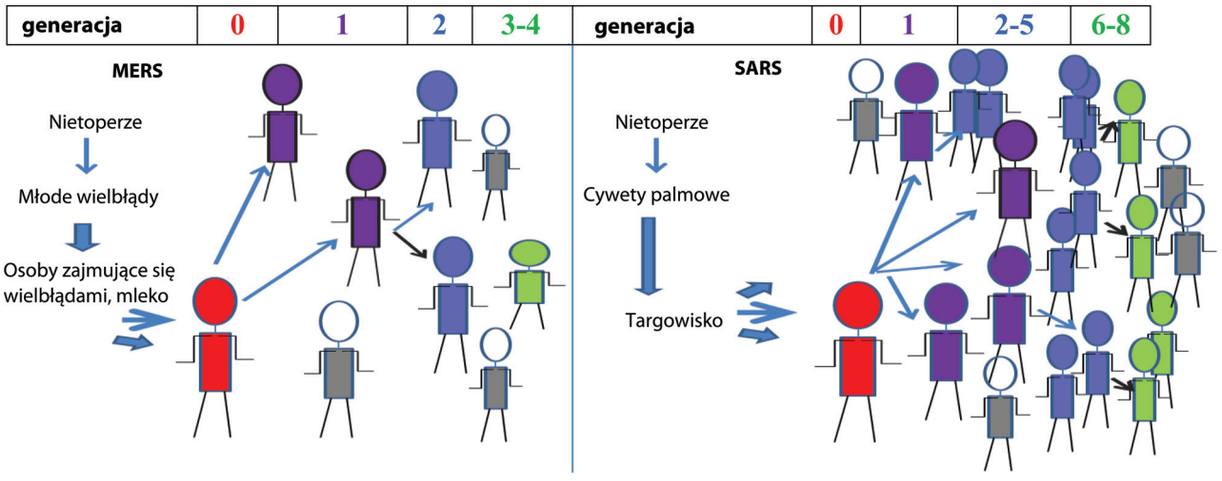
Tabela I
Porównanie epidemiologii oraz objawów w zakażeniach koronawirusami SARS i MERS

Cecha	SARS	MERS
Po raz pierwszy opisany	XI.2002	IX.2012
Występowanie zachorowań	> 80% Chiny; ogółem 29 krajów na całym świecie	> 80% Płw. Arabski, głównie Arabia Saudyjska; ogółem 27 krajów
Wiek pacjentów (lata)	93% dorośli zakres 1–91, mediana = 40	98% dorośli zakres 1–99; mediana = 48
Płeć chorych M:K	43 : 57	64,5 : 35,5
Okres inkubacji	zakres 2–14 dni; śr. 4,6 dnia;	zakres 2–15 dni; śr. 5,2 dnia;
Umieralność ogółem	9,6%	39%
Czas od objawów do zgonu – mediana (dni)	21,0–23,7	12,0
Czas od objawów do hospitalizacji (dni)	2–8	0–16
Częstość zakażeń chorych z innymi obciążeniami	10–30%	60–80%
Częstość zakażeń wtórnych wśród pracowników opieki medycznej	21%	13%
Objawy (%) – odsetek osób zakażonych zgłaszających objawy		
Gorączka > 38°C	55–100	98
Dreszcze	15–73	55–87
Kaszel nieproduktywny	62–100	63–83
Krwioplucie	0–1	0–17
Ból głowy	2–56	0–11
Ból mięśni	5–61	14–32
Krótki oddech	1–40	48–74
Ból gardła	3–30	14–17
Katar	2–24	0–10
Biegunka	12–50	2–26
Wymioty	1–35	0–21
Mdłości	20–35	0–21
Uszkodzenie nerek	brak danych	55
ARDS	u ok. 20%	u ok. 80%
Leczenie respiratorem	14–30%	80%
Średni czas do wentylacji (dni)	11	7
Przebieg	typowy dwufazowy	od asymptomatycznych do ARDS
Towarzyszące obciążenia (%)	Ogółem u ok. 10–30%	Ogółem u ok. 60–75%
Cukrzyca	24	10
Choroby nerek	2–6	13
Choroby serca	10	7,5
Nowotwór	3	2
Nadciśnienie	19	34
Otyłość	brak danych	17
Nikotyzm	17	23
Wirusowe zapalenie wątroby	27	brak danych

Na podstawie: [2, 3, 10, 12, 15, 20, 23]

wirusem MERS dalej niż do 4 generacji (pacjent z pierwotnym zakażeniem traktowany jest jako generacja 0). W większości przypadków zakażenia MERS obserwowano do 2 generacji. Natomiast zakażenia SARS szerzyły się znacznie dalej – aż do 8 generacji, zaś najczęściej do 5 generacji (ryc. 4).

Ponadto w ogniskach zakażeń szpitalnych wywołanych przez MERS-HCoV w Południowej Korei (186 przypadków) oraz w Al-Hasa (24 chorych) dominowały zakażenia innych pacjentów przebywających w tym samym szpitalu/oddziale, odpowiednio 62,3% i 83,3%. Tak wysoki udział osób hospitalizowanych



Ryc. 4. Schemat transmisji zakażenia koronawirusem SARS i MERS – porównanie

Objaśnienia: czerwona sylwetka człowieka – pierwotne zakażenie (pacjent 0); sylwetka fioletowa – zakażenie wtórne (generacja 1); sylwetka niebieska – generacja 2 i kolejne generacje na ogół obserwowane; sylwetka zielona – zakażenie kolejnych osób – generacje rzadko obserwowane; sylwetka szara – osoby niezakażone.

z powodu innych schorzeń, jest prawdopodobnie przyczyną wysokiej śmiertelności w tych ogniskach: w Południowej Korei – 20,0 %, a w Al-Hasa – aż 65,0%. Pracownicy opieki medycznej stanowili w tych szpitalnych ogniskach MERS od 8,3 do 13,5%. Natomiast w ogniskach SARS w szpitalach w Singapurze (74 osób), Toronto (216 chorych) i Wietnamie (63) zakażeniom ulegali przede wszystkim pracownicy opieki medycznej oraz osoby odwiedzające chorych. Szczególnie wysoki odsetek wtórnych przypadków SARS w tych ogniskach obserwowano wśród pracowników, odpowiednio: 41,0%; 42,6% oraz 59,0% [4, 6, 25].

Tak szerokie szerzenie się zakażenia związane jest prawdopodobnie ze zjawiskiem tzw. super-spreading. W ten sposób określa się zdolność szerzenia się zakażenia bezpośrednio od jednego pacjenta (tzw.0) na wiele osób. Jako miarę podaje się często Indeks R_0 – czyli średnią liczba osób zakażonych przez jedną osobę (index reproduction number). W ognisku szpitalnym MERS w Płd. Korei wyniósł on 30, natomiast w ognisku SARS w Singapurze – 22 [6].

W ognisku MERS w szpitalu w Korei Płd. stwierdzono zjawisko „super-spreading" u 2 pacjentów. Pierwszy pacjent (pacjent 0) zakaził 30 osób, a kolejny pacjent spośród tych 30-tu (pacjent generacji 1) – przekazał zakażenie wirusem MERS aż 80 osobom. Zjawisko to obserwowane było w zakażeniach MERS jedynie w ogniskach w szpitalu. Natomiast w zakażeniach wirusem SARS „super-spreading" obserwowano zarówno w środowisku szpitalnym, jak i poza nim [20, 22, 25]. Być może różnice te związane są z charakterystyką osób zakażonych tymi wirusami.

Szerzenie się zakażeń w szpitalu zależy od wielu czynników: właściwości danego wirusa, indywidualnych właściwości pacjentów takich jak wydalanie wirusa, a także zastosowanych procedur medycznych, typu kontaktu, zagęszczenia pacjentów, zwyczajów itp. Istotne znaczenie mają procedury obowiązujące w szpitalu i opracowane w celu zapobiegania szerzenia się zakażeń, włączając w to: dostępność środków dezynfekcyjnych i środków ochrony osobistej, filtry w systemie wentylacji, podciśnienie w izolatce, reżim odwiedzin itp.

Dane z ognisk szpitalnych wskazują na wysoki potencjał epidemiczny obu tych koronawirusów, szczególnie w środowisku szpitalnym, mimo różnych dominujących grup wśród tzw. wtórnych zakażeń. Konieczne jest więc stosowanie rygorystycznych zasad higieny w celu przecięcia dróg szerzenia się tych zakażeń.

8. Podsumowanie

Pandemiczne koronawirusy człowieka: MERS-CoV i SARS-CoV zostały opisane dopiero w XXI wieku. Mimo, że wirusy te oraz zachorowania przez nie wywołane wykazują szereg podobieństw, to wykazano szereg różnic w strukturze genomu, mechanizmach zjadliwości i chorobotwórczości, obserwowanych objawów, a także dróg szerzenia się zakażeń itp. Najważniejszą, z punktu widzenia człowieka, jest różnica dotycząca stopnia utrwalenia przekazywania zakażeń na drodze człowiek-człowiek. Wirus MERS wykazuje znacznie niższą niż wirus SARS zdolność do wywoływania zakażeń powyżej 3 generacji w łańcuchu zakażeń. Jednak epidemia wywołana przez HCoV-SARS wygasła po ok. 2 latach, natomiast zachorowania wywołane przez koronawirusa MERS nadal występują – począwszy od 2012 r. W czasie 5 lat występowania zakażeń wirusem MERS obserwowano istotne zmiany w liczbie i kategorii zgłaszanych zachorowań. Związane jest to

z rozwojem naszej wiedzy nt. biologii wirusa HCoV--MERS, metod rozpoznawania i zapobiegania zakażeniom, możliwości terapeutycznych itp. Ponadto, występowanie zakażeń bezobjawowych lub skąpo-objawowych, krążenie wirusa MERS w bliskim otoczeniu człowieka (wielbłądy) oraz aktywność różnych koronawirusów wśród tych zwierząt powoduje, że prawdopodobieństwo całkowitego wygaśnięcia epidemii MERS jest obecnie niewielkie. Należy także monitorować sytuację epidemiczną w celu wykrycia ewentualnego nowego wariantu wirusa HCoV-MERS (np. o utrwalonej zdolności transmisji zakażenia na drodze człowiek--człowiek) lub nowego pandemicznego koronawirusa.

Piśmiennictwo

1. Abramczuk E., Pancer K., Gut W., Litwińska B.: Niepandemiczne koronawirusy człowieka – charakterystyka i diagnostyka. *Post. Mikrobiol*. **56**, 205–213 (2017)
2. Alsahafi A.J., Cheng A.C.: The epidemiology of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the Kingdom of Saudi Arabia, 2012–2015. *Int. J. Infect. Dis.* **45**, 1–4 (2016)
3. Assiri A., Al-Tawfiq J.A., Al-Rabeeah A.A., Al-Rabiah F.A., Al-Hajjar S., Al-Barrak A., Flemban H., Al-Nassir W.N.: Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 752–61 (2013)
4. Assiri A., Memish Z.A. i wsp.: Hospital outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *N. Engl. J. Med*. **369,** 407–416 (2013)
5. Chan R.W.Y., Peiris J.S.M. i wsp.: Tropism of and innate immune responses to the novel human betacoronavirus lineage C virus in human *ex vivo* respiratory organ cultures. *J. Virol*. **87**, 6604–6614 (2013)
6. Chowell G., Abdirizak F., Lee S., Lee J., Jung E., Nishiura H., Viboud C.: Transmission characteristics of MERS and SARS in the healthcare setting: a comparative study. *BMC Med.* **13**, 210–222 (2015)
7. Corman V.M., Memish Z.A. i wsp.: Viral shedding and antibody response in 37 patients with MERS-coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis*. **62**, 477–483 (2016)
8. Ding Y., Jiang S. i wsp.: Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J. Pathol.* **203**, 622–630 (2004)
9. van Doremalen N., Bushmaker T., Munster V.J.: Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *EuroSurveill.* 18(38): pii=20590 (2013)
10. Drosten C., Wendtner C.M.: Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 745–51 (2013)
10. European Centre for Disease Prevention and Control: ECDC Communicable Disease Threats Report, 26 week, 25June -1July 2017, https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/ documents/Communicable-disease-threats-report-01-jul-2017.pdf (5.07.2017)
11. Fowler RA, Lapinsky SE, Hallet D, Detsky AS, Sibbald WJ, Slutsky AS, Stewart A. Critically ill patients with SARS. *JAMA,* **290**, 367–373 (2003)
12. Gralinski L.E., Baric R.S.: Molecular pathology of emerging coronavirus infections *J. Pathol.* **235**, 185–195 (2015)
13. Horby P.: New data on clinical features, incubation period, and case fatality rate of SARS in Hong Kong and Canada. *Euro Surveill*. 7(19):pii=2223. (2003)
14. Hui D.S., Memish Z.A., Zumla A.: Severe acute sepiratory syndrome vs. the Middle East respiratory syndrome. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **20**, 233–241 (2014)
15. Lau S.K.P., Lau C.C.Y., Chan K.H., Li C.P.Y., Chen H., Jin D.Y., Chan J.F.W., Woo P.C.Y., Yuen K.Y. : Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: implications for pathogenesis and treatment. *J. Gen. Virol.* **94**, 2679–2690 (2013)
16. Lokugamage K.G., Narayanan K., Nakagawa K., Terasaki K., Ramirez S.I., Tseng C.K., Makino S.: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp1 inhibits host gene expression by selectively targeting mRNAs transcribed in the nucleus while sparing mRNAs of cytoplasmic origin. *J. Virol.* **89**, 10970–10981 (2015)
17. Lu G., Wang Q., Gao G.F.: Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends Microbiol.* **23**, 468–478 (2015)
18. Lui P.Y., Wong L.Y.R., Fung C.L., Siu K.L., Yeung M.L., Yuen K.S., Chan C.P., Woo P.C.Y., Yuen K.Y., Jin D.Y.: Middle East respiratory syndrome coronavirus M protein suppresses type I interferon expression through the inhibition of TBK1-dependent phosphorylation of IRF3. *Emerg. Microbes. Infect.* **5**, e39 (2016)
19. Liu S., Chan T.C., Chu Y.T., Wu J.T.S., Geng X., Zhao N., Cheng W., Chen E., King C.C.: Comparative epidemiology of human infections with Middle East Respiratory Syndrome and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronaviruses among healthcare personnel. *Plos One,* **11**: e0149988 (2016)
20. Mackay I.M., Arden K.E.: MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virol. J.* **12**, 222 DOI 10.1186/ s12985-015-0439-5 (2015)
21. Nam H.S., Park J.W., Ki M., Yeon M.Y., Kim J., Kim S.W.:. High fatality rates and associated factors in two hospital outbreaks of MERS in Daejeon, the Republic of Korea. *Int. J. Infect. Dis*. **58**, 37–42 (2017)
22. Poutanen S.M., McGeer A.J. i wsp.: Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome in Canada. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1995–2005 (2003)
23. Sabir J.S.M., Guan Y. i wsp.: Co-circulation of three camel coronavirus species and recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia. *Science*, **351**, 81–84 (2016)
24. Svoboda T., Glazier R.H.: Public health measures to control the spread of the Severe Acute Respiratory Syndrome during the outbreak in Toronto. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2352–2361 (2004)
25. Wong L.Y., Lui P.Y., JinD.Y.: A molecular arms race between host innate antiviral response and emerging human coronaviruses. *Virol. Sin*. **31**, 12–23 (2016)
26. World Health Organization: Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003, http:// www.who.int/csr/sars/country/ table2004_04_21/en/ (28.06.2017)
27. Vijay R., Perlma S.: Middle East respiratory syndrome and severe acute respiratory syndrome. *Curr. Opin. Virol*. **16**, 70–76 (2016)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 33–40
http://www.pm.microbiology.pl

PAPILLOMAWIRUSY: HPV JAKO CZYNNIK ETIOLOGICZNY NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI

Michał Wiciński, Kamil Leis*, Bartosz Malinowski, Mateusz Maciej Węclewicz, Elżbieta Grześk, Grzegorz Grześk

Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano w listopadzie 2017 r.

Streszczenie: Wirus HPV, należący do *Papillomaviridae*, powoduje raka jąder, płuc, głowy oraz szyi. Obecnie szacuje się, że istnieje około 190 rodzajów HPV. Ponad 700 milionów osób na całym świecie jest zarażonych tym wirusem. W Stanach Zjednoczonych co roku występuje 14 milionów nowych zakażeń. Najczęściej zmiany nowotworowe głowy i szyi powodują wirusy HPV typu 16 i 18. Pacjent zakaża się wirusem poprzez kontakt nabłonka z wirusem lub inną zainfekowaną tkanką nabłonkową, na przykład w efekcie stosunku płciowego. Możliwe jest również przekazywanie patogenu od matki podczas porodu. Choroby związane z HPV to np. rak krtani, leukoplakia, rak migdałków lub choroba Bowena. Dostępne są szczepionki np. 9-walentna szczepionka przeciwko HPV o nazwie Gardasil-9.

1. Wstęp. 2. Budowa HPV. 3. Systematyka. 4. Infekcja. 5. Chorobotwórczość. 6. Leczenie. 7. Szczepionki. 8. Podsumowanie

Papillomaviruses: HPV as the etiological factor of head and neck cancers

Abstract: The HPV virus, belonging to papillomaviruses, causes genital, lung, head and neck cancers. It is currently estimated that there are 190 types of HPV. Over 700 million people worldwide are infected with the virus. In the United States, 14 million new infections occur every year. The most common HPV types responsible for carcinogenesis of head and neck areas are types 16 and 18. The virus infects human epithelial cells, for example during a sexual intercourse. Transmission from mother to child during birth is also possible. There is evidence linking HPV with laryngeal cancer, leukoplakia, tonsil cancer or Bowen's disease. HPV vaccines are available to help prevent infection by certain types of the virus, e.g. 9-valent HPV vaccine called Gardasil-9.

1. Introduction. 2. Structure of HPV. 3. Taxonomy. 4. Infection. 5. Pathogenicity. 6. Treatment. 7. Vaccines. 8. Summary

Słowa kluczowe: HPV, papillomawirusy, nowotwory głowy i szyi
Key words: HPV, papillomaviruses, head and neck cancers

1. Wstęp

Dane zawarte w piśmiennictwie potwierdzają występowanie około 190 typów HPV [26], lub według innych źródeł około 150 [9, 16]. Właściwości onkogenne wykazuje 30–40 z nich z czego 13 to tzw. typy wysokiego ryzyka [30, 67]. Wirusy te zaangażowane są w patogenezę nowotworów narządów płciowych, szczególnie macicy, jelita grubego, odbytu, płuc, jamy ustnej, głowy, szyi oraz przełyku [5]. Jako czynniki zakaźne mogą być współodpowiedzialne za procesy neurodegeneracyjne oraz sprzyjać rozwojowi schizofrenii [68, 70].

Najczęstszym czynnikiem etiologicznym nowotworów obszaru głowy i szyi jest HPV 16. Występuje u około 40% pacjentów ze zdiagnozowanym guzem HPV (+). Obecność HPV 18 potwierdza się natomiast u 12% chorych [27]. HPV 16 odpowiada także za 70% raków jamy ustnej i gardła [66]. W chwili obecnej około 709 mln ludzi jest zakażonych HPV, a na terenie samych Stanów Zjednoczonych co roku dochodzi do 14 mln nowych zachorowań [16].

2. Budowa HPV

Wirion ludzkiego brodawczaka ma kształt ikozahedralny i jest nieosłoniony. Wielkość pojedynczego wirusa wynosi około 55 nm. Każdy kapsyd składa się z 72 kapsomerów, o kształcie pentamerów, zbudowanych z białka strukturalnego L1, a także L2 [2, 20].

Kolisty, dwuniciowy genom DNA zawiera 8000 par zasad [2, 20]. Geny kodowane przez wirusa są nazywane wczesnymi – E (Early), zajmującymi ponad 50% genomu wirusowego [72] i późnymi – L (Late), stanowiącymi z kolei 40% genomu [72]. Geny te zlokalizowane są na jednej nici [29]. Białka E1 oraz E2 inicjują replikację wirusowego DNA. Białko E4 reguluje interakcje pomiędzy białkami patogenu a keratynami, produkowanymi przez keratynocyty. Powoduje to zmiany w tych ostatnich, widoczne jako efekt cytopatyczny. Białka E5-E7 biorą udział w procesie komórkowej transformacji lub w proliferacji zainfekowanych komórek [34]. U niektórych papillomawirusów występuje także białka E3 oraz np. u HPV 31-E8 [72].

* Autor korespondencyjny: Kamil Leis, ul. M. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz; tel. 72 154 11 29;
e-mail: kamil.leis@interia.pl

Tabela I
Podział typów wirusa HPV na onkogenne i nieonkogenne

	Typ HPV	Rola
Onkogenne (wysokiego ryzyka)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 69	Powstawanie zmian przedrakowych oraz raka inwazyjnego
Nieonkogenne (niskiego ryzyka)	6, 11, 32, 44, 53, 57, 81	Powstawanie niezłośliwych zmian, takich jak brodawczaki błony śluzowej czy brodawki skórne

Na podstawie [29]

Składnikiem genomu wirusa ludzkiego brodawczaka jest także NCR (Noncoding Control Region), zwany też LCR (Long Control Region) – region regulatorowy [29] – nie bierze udziału w procesie kodowania białek strukturalnych ale uczestniczy w syntezie DNA [34]. Jego długość wynosi 850 pz i stanowi 10% genomu [72]. W tabeli I przedstawiono podział poszczególnych typów wirusa na onkogenne i nieonkogenne.

3. Systematyka

Wirus ludzkiego brodawczaka należy do rodziny *Papillomaviridae* [26]. Nazwa grupy pochodzi od łacińskiego słowa *papilla*, oznaczającego brodawki oraz od greckiego przyrostka *oma-* służącego do tworzenia nazw, oznaczających guzy [25]. Początkowo *Papillomaviridae* należało do jednej grupy *Papovaviridae*, razem z *Polioviridae*. W 2000 roku International Committee on Taxonomy of Viruses rozdzielił je na dwie odrębne rodziny [31]. Klasyfikacja *Papillomaviridae* na zasadzie podobieństwa sekwencji DNA została ustalona dopiero w 2003 roku [14]. Obecnie wyróżnia się 29 rodzajów Papillomawirusów (m.in. *Deltapapillomavirus*, *Dyodeltapapillomavirus*, *Alphapapillomavirus*, *Kappapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Dyopipapillomavirus Upsilonpapillomavirus*, *Omikronpapillomavirus*, *Omegapapillomavirus*, *Xipapillomavirus*) [57] oraz 189 typów. Chorobotwórcze dla ludzi jest jedynie 5 rodzajów [3, 11]. Należą do nich: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* i *Nupapillomavirus*. Z materiału pobranego od pacjentów wyizolowano 66 α-PV, 45 β-PV, 54 γ-PV, 2 μ-PV oraz tylko 1 η-PV [10]. Uważa się, że rodzina ta ewoluuje 5–10 razy szybciej niż ich żywiciele, którymi są ssaki [57].

Wszystkie papillomawirusy mają ikozahedralny kształt a ich kapsyd jest zbudowany z 72 pentamerów. Genom zawiera około 8 kb (genom *Mupapillomavirus* liczy 7,3 kb a Lambdapapillomavirus 8,6 kb), jego rozmiar waha się w przedziale 6,8–8,4 kb, białka natomiast w przedziale 7–73 kDa [25]. Wielkość pojedynczego wirusa wynosi zazwyczaj 52–55 nm. Wyjątek stanowią *Epsilonpapillomavirus, Betapapillomavirus* i *Gammapapillomacvirus*, osiągające rozmiary do 60 nm [59–64].

Mogą występować również formy cewkowate oraz nitkowate, powstałe na skutek nieprawidłowości w procesie dojrzewania [25]. Gęstość wyporu wirionów w CsCl wynosi 1,2 g/cm³, natomiast w roztworze sacharozy 1,34–1,35 g/cm³. Papillomawirusy wykazują odporność na działanie eteru, kwasów oraz wysokiej temperatury (temp. ok. 50°C przez 1 godzinę) [25]. Oprócz infekcji u ludzi rodzina ta wywołuje także wiele chorób u zwierząt. W tabeli II dokonano zestawienia rodzajów *Papillomaviridae*.

4. Infekcja

Pacjenci zarażają się wirusem podczas kontaktów seksualnych z zainfekowaną osobą. Szczególnie seks analny i oralny obarczony jest dużym ryzykiem [9, 48]. Do infekcji dochodzi podczas kontaktu tkanek nabłonkowych obu partnerów seksualnych [29].

Istnieją również przypadki, gdzie zarażona matka przekazała wirus dziecku podczas porodu. Najczęstsze powikłanie stanowi zajęcie struktur układu oddechowego. Rozwijają się łagodne nowotwory-brodawczaki krtani, z tendencją do nawrotów [9, 50]. Mówi się wówczas o JORRP (Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis) [15]. Hirnle, w 2013 roku opisała przypadek dziecka, urodzonego drogą cesarskiego cięcia, u którego doszło do transmisji wirusa z matki. U dziecka zaobserwowano nawracające chrypki, kaszel oraz infekcje dróg oddechowych. Zdiagnozowano brodawczakowatość krtani [24]. Możliwa jest również transmisja poprzez krew [5] lub poprzez skażone przedmioty [56]. W 2017 roku opublikowano wyniki badania, według którego drogą szerzenia się infekcji może być mleko zakażonej matki. Analiza mikrobiologiczna wykazała obecność typów: 6, 16, 18, 33, 45, 53, 56, 59, 66 oraz 82. Szczególnie istotny wydaję się fakt, iż zakażony może zostać partner, lecz nie dziecko [33]. Osoby z niedoborami odporności np. poddane immunosupresji lub zakażone HIV, czy CMV [69] są w grupie podwyższonego ryzyka zarówno infekcji wirusem HPV, jak i rozwojem chorób z nim związanych [2]. Do grupy tej zalicza się również pacjentów zainfekowanych *Chlamydia trachomatis*, co może wskazywać na częstą aktywność seksualną i licznych partnerów seksualnych, ponieważ zakażenia te nie są ze sobą powiązane [2]. Uważa się, że duża liczba partnerów seksualnych, młody wiek rozpoczęcia współżycia obecność chorób

Tabela II
Podział wybranych rodzajów *Papillomaviridae*

Rodzaj *Papillomaviridae*	Gatunek zarażający dane zwierzę	Skrót gatunku
Alphapapillomavirus	Brodawczak szympansów 1	PCPV-1
	Brodawczak szympansów 1	PCPV-1C
Deltapapillomavirus	Brodawczak łosi europejskich	EEPV
	Brodawczak jeleni	DPV
	Brodawczak bydła 1	BPV-1
	Brodawczak bydła 2	BPV-2
	Brodawczak reniferów	RPV
	Brodawczak owiec 1	OvPV-1
	Brodawczak owiec 2	OvPV-2
Epsilonpapillomavirus	Brodawczak bydła 5	BPV-5
Zetapapillomavirus	Brodawczak koni 1	EcPV
Etapapillomavirus	Brodawczak *Fringilla coelebs* (zięba zwyczajna)	FcPV
Thetapapillomavirus	Brodawczak *Psittacus erithacus* timneh (papuga szara)	PePV
Iotapapillomavirus	Brodawczak *Mastomys natalensis* (Myszorówka natalska)	MnPV
Kappapapillomavirus	Brodawczak *Sylvilagus* (Królak)	CRPV
	Brodawczak jamy ustnej królików	ROPV
Lambdapapillomavirus	Brodawczak jamy ustnej psów	COPV
	Brodawczak jamy ustnej kotów	FdPV
Xipapapillomavirus	Brodawczak bydła 3	BPV-3
	Brodawczak bydła 4	BPV-4
	Brodawczak bydła 6	BPV-6
Omikronpapillomavirus	Brodawczak *Phocoena spinipinnis* (Morświn czarny)	PSPV
Pipapillomavirus	Brodawczak jamy ustnej chomików	HaOPV
Należące do *Papillomaviridae*, ale nie zaklasyfikowane jako gatunki	Brodawczak *Trichosurus Vulpecula* (Kitanka lisia)	TvPV
	Brodawczak oposów	PoPV

Na podstawie [25]

przenoszonych droga płciową, polimorfizmy TGF b-1, podeszły wiek (powyżej 60 r.ż.) oraz płeć męska również stanowią czynniki ryzyka nowotworów głowy i szyi HPV (+) [23, 27, 45, 51]. Osoby obrzezane natomiast wykazują mniejsze ryzyko infekcji tym patogenem [46].

Wirus wykazuje tropizm do nabłonka wielowarstwowego płaskiego (okolice gardła, skóry, narządów płciowych oraz jamy ustnej), zajmując warstwę podstawną [49]. Po internalizacji wirusa, zajęte komórki dalej produkują materiał genetyczny (w odróżnieniu od zdrowych, gdzie proces ten jest zatrzymany) [45]. Cykl lityczny dzieli się na dwa okresy. W pierwszym ma miejsce przyłączenie do komórki, penetracja, przejście materiału genetycznego wirusa do komórki, ekspresja tego materiału i aktywacja wybranych układów gospodarza pełniących funkcje regulatorowe. W trakcie drugiego etapu ma miejsce proces wytworzenia wirionów potomnych [37]. Na powierzchni keratynocytów występują receptory, do których należy m.in. α6β4, biorące udział w procesie penetracji wirionu wraz z materiałem genetycznym wirusa do komórki. Uważa się też, że wirusy mogą łączyć się z integrynami lub siarczanem heparyny [6]. Następnie DNA przenika do naskórkowej warstwy podstawnej, przechodząc w fazę uśpienia – latencji jako episom. W takiej formie występuje zazwyczaj w niewielu kopiach (od 10 do 100). W komórkach takich ekspresja białek wczesnych wirusa jest na bardzo niskim poziomie [6]. Istnieje również możliwość integracji materiału genetycznego patogenu z materiałem gospodarza (występuje zazwyczaj w formach nowotworowych) [55]. Sam proces penetracji inicjowany jest przez białko L1. Białko L2 natomiast podwyższa efektywność zakażenia. Wirion wnika do wewnątrza komórki w procesie endocytozy, zależnej od klatryny. Zachodzi odpłaszczenie materiału genetycznego patogenu w lizosomach bądź endosomach. Białko L2 transportuje materiał do jądra komórkowego. Bierze w tym udział także receptor – syntaksyna 18. L2 łączy się na jednym końcu – końcu N ze wspomnianą syntaksyną a na drugim – końcu C z dyneiną [6]. Podczas cyklu komórkowego następuje replikacja DNA wirusa, z współudziałem białek gospodarza (Replikacja HPV jest zależna od procesów różnicujących keratynocyty) [20]. Zachodzi ona jedynie w komórkach proliferujących, w jądrze [34, 72]. Proces

replikacji oraz transkrypcji warunkuje ekspresja białek wczesnych. Białka budujące kapsyd wirusowy są syntetyzowane tylko w dojrzałych keratynocytach, w zewnętrznych warstwach nabłonka [55]. Odpowiedzialne za to są białka regionu późnego [37].

Transkrypcja wirusa HPV przebiega z wykorzystaniem komórkowej polimerazy RNA. Składa się z dwóch etapów (w pierwszym etapie transkrybowane są geny, które wytwarzają produkty biorące udział w procesie replikacji DNA wirusa, w drugim zaś geny odpowiedzialne za produkcję wirusowych białek strukturalnych), zaczynających się w rejonie kontrolnym, gdzie znajdują się również miejsca inicjacji replikacji [37]. Przykładowo w wirusie HPV typu 16 wyróżnia się dwa promotory – P97, odpowiadający za ekspresję genów wczesnych oraz P670 – odpowiadający za ekspresję genów późnych. Komórki zainfekowane HPV wykazują podwyższoną ekspresję niektórych białek odpowiedzialnych za splicing, jak np. białka z rodziny SR czy SF2/ASF. Podwyższeniu ekspresji towarzyszy zazwyczaj pojawienie się mRNA dla L1. W innych typach wirusa procesy te wyglądają podobnie [6].

W komórkach zmienionych nowotworowo, wtórnie do infekcji HPV wykazano, iż materiał genetyczny wirusa występuje w postaci zintegrowanej z materiałem gospodarza [37].

Procesem warunkującym nieograniczony, niekontrolowany wzrost komórek jest ekspresja białek E6 oraz E7. Poziom ekspresji jest zależny od wirusowych właściwości onkogennych oraz stopnia zaawansowania choroby. W miarę progresji onkoproteiny indukują powstawanie mutacji. Te z kolei wpływają na poziom ekspresji E6 i E7, co indukuje transformację nowotworową komórki [37]. Białko E5 działa na EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), skutkując aktywacją ścieżki Ras-Raf-MAP, zwaną inaczej szlakiem MAPK/EPK. Prowadzi to do nasilenia procesu proliferacji komórkowej [65], hamując tym samym apoptozę [6]. E5 działa także na PDGF, EGF oraz CGF. Skutkiem nadekspresji tego białka jest zaburzenie działania MHC I i II. Indukuje również onkogeny, np. Jun B i c-Jun [6]. E6 oraz E7 kodują onkoproteiny. Onkoproteina E6 powoduje rozkład białka p53 gospodarza a także aktywuje enzym telomerazę, co przyspiesza proces starzenia się komórki [2, 40]. Białko E6 tworzy kompleks z ligazą ubikwityny. Do niego przyłącza się region degradacji p53 a całość jest degradowana w proteosomie w procesie ubikwityno-zależnej proteolizy [37, 55, 65]. Reaguje też z BCL oraz BXL, odpowiedzialnymi za apoteozę komórki [6]. Wpływa również hamująco na ekspresję Notch1 [6]. E6 łączy się z c-myc, tworząc kompleks, który indukuje ekspresję hTERT. To z kolei ma działanie proliferacyjne. Onkoproteina E7 rozkłada natomiast pRB [34, 40]. Procesy te wpływają na transformację nowotworową komórek gospodarza (w przypadku typów onkogennych HPV). Prawdopodobnie, podczas łączenia się E7 z pRB, onkoproteina współzawodniczy z cykliną D1. Skutkuje to uwolnieniem czynnika E2F, w wyniku czego komórka, z fazy G1/S, przechodzi do kolejnych stadiów cyklu podziałowego [45]. Do białka E7 przyłączają się białka p107 i p130. E7 oddziałuje również na p21 oraz p27. Białka te uczestniczą w przejściu z fazy G1 cyklu komórkowego do cyklu S [6]. Poprzez połączenie pRB z E7 uwalniany jest czynnik E2F. Poprzez wiązanie tego czynnika z promotorami genów od niego zależnymi komórka wchodzi w cykl S [37]. Na skutek integracji materiałów genetycznych wirusa oraz gospodarza następuje przerwanie ORF. Prowadzi to do wzrostu ekspresji genów, odpowiedzialnych za kodowanie E6 oraz E7, będących białkami onkogennymi, oraz do dalszej proliferacji komórkowej [55].

W składaniu dojrzałego wirionu biorą udział białka E2, E4 i L2. To ostatnie wpływa na formowanie się kapsydu oraz na jego stabilność. W czasie składania białko to znajduje się w pobliżu POD (PML Oncogenic Domain) zwanych również ND-10 (Nuclear Domain 10). Pełnią one funkcję miejsca replikacji materiału genetycznego wirusa. Złożone cząsteczki wirusa uwalniane są z komórki poprzez egzocytozę, jedynie w zewnętrznych warstwach nabłonka. Procesowi temu towarzyszy E4 [6].

Onkoproteiny HPV hamują produkcje genów supresorowych, co uniemożliwia im kontrolowanie prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego. Skutkiem tego są korzystniejsze rokowanie i lepsza efektywność leczenia (takiego jak np. radioterapia) [23] w porównaniu z nowotworami HPV (–) [18, 45]. Na podstawie badania z 2015 roku, Cantrell i wsp. stwierdzili, że palenie papierosów pogarsza u tych chorych rokowanie, jednak nie ma wpływu na przerzuty do węzłów chłonnych [8]. Przebadano 83 pacjentów z HPV dodatnimi rakami głowy i szyi oraz 46 guzów w ramach projektu TCGA – Cancer Genome Atlas Project. Analiza genomów chorych z pobranych bioptatów wykazała powtarzające się geny, m. in. PIK3CA, występujące okresowo, z częstością większą niż 3% [54]. Zaobserwowano również zmiany CNV (Copy Number Variants) na ramieniu q chromosomu 3.

5. Chorobotwórczość

W przypadku raków głowy oraz szyi znajomość patogenezy HPV jest znacznie mniej poznana niż w przypadku nowotworów szyjki macicy. Krytycznym momentem w powstawaniu raka, po uprzedniej infekcji HPV jest fuzja DNA wirusa z genomem gospodarza [40]. Istotny czynnik stanowi także wspomniana wcześniej rola E6 oraz E7. Nowotwory te charakteryzują się niską ekspresją EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), w przeciwieństwie do tych HPV ujemnych [22].

Raki jamy ustnej i gardła HPV (+) cechują się brakiem istotnego rogowacenia, bazaloidalną morfologią, zrazikowym wzrostem oraz przesączeniem przez limfocyty [66]. W 2014 roku przeprowadzono badanie, w którym analizowano 82 chorych z płaskonabłonkowymi rakami jamy ustnej oraz gardła. HPV został wykryty w 21 przypadkach, z czego HPV 16 stanowiło 1/3 a HPV 18–14,3% [41].

Brodawczaki krtani

Zmiany te są najczęściej spowodowane przez typy HPV-6 oraz HPV-11 [1, 13, 35]. Abramson i wsp. przeprowadzili analizę, w grupie 26 pacjentów z brodawkami krtani pod kątem HPV. 92% zmian posiadało dwa wyżej wymienione typy tego patogenu [1].

Brodawczaki mogą powstawać wskutek zakażenia podczas porodu, jako infekcja okołoporodowa [9, 13, 50]. Charakteryzują się tendencją do rozprzestrzeniania w obrębie układu oddechowego oraz do częstych nawrotów [13]. Odnotowano największą zachorowalność w ciągu pierwszych pięciu lat życia [13, 21]. Uważa się, że wśród dorosłych częściej chorują mężczyźni [13].

Brodawczaki układu oddechowego mogą też występować w nosogardzieli, podniebieniu miękkim, tchawicy, oskrzelach, przedsionku nosa [28] a także w płucach (zazwyczaj śmiertelna postać brodawczakowatości układu oddechowego) [35]. Powstają z częstością (w samych Stanach Zjednoczonych) 4,3 na 100 tys. dzieci i 1,8 na 100 tys. dorosłych. Transformacja nowotworowa występuje z częstością na poziome 3–5% [35].

Liu i wsp., w 2016 roku potwierdzili występowanie nowotworowych komórek PD-L1 pozytywnych u chorych na JRRR, co daje w przyszłości możliwość leczenia opartego na immunomodulacji komórek układu odpornościowego [32].

Rak krtani HPV (+)

Nowotwór ten, oprócz papierosów, alkoholu, ekspozycji na azbest czy predyspozycji genetycznych ma także udowodnioną etiologię infekcji wirusem ludzkiego brodawczaka. Wykazano również, że w grupie osób o niższym statusie socjoekonomicznym śmiertelność była znacznie wyższa. Do najczęstszych typów HPV powodujących te zmiany należą typy: 16, 18, 31, 33. Rak krtani stanowi 30–35% wszystkich guzów krtani. Dane zawarte w piśmiennictwie nie są zgodne, co do częstości zakażeń HPV u chorych na nowotwór krtani. Szacuje się, że występowanie wirusa waha się w przedziale 5–70% [27].

Choroba Bowena

Schorzenie wywołuje następujące typy HPV: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 48. Stanowi formę In situ raka kolczystokomórkowego. Ryzyko transformacji do inwazyjnego raka skóry wynosi 3–5%. Wykazano znacznie częstsze występowanie w populacji męskiej – aż 80%. Zmiana cechuje się zazwyczaj dobrym odgraniczeniem od zdrowej tkanki. Progresja choroby jest powolna, przyjmuje postać plam lub płytek, czasem pokrytych strupem [7, 34, 44]. Zazwyczaj występuje pojedynczo, lecz nawet do 10–20% zmian ma charakter mnogi [7].

Zmiany chorobowe lokalizują się dość często w obrębie twarzy. Utrudnia to prawidłową diagnozę, gdyż podobny obraz kliniczny pojawia w takich jednostkach chorobowych jak np. łuszczyca, choroba Pageta czy rogowacenie łojotokowate [44].

Rak podstawnokomórkowy o etiologii HPV

Rak ten wzrasta powoli a odsetek przerzutów jest bardzo niski. Najczęściej chorują osoby po 65 r.ż. Jedną z głównych lokalizacji nowotworu stanowi twarz (30% w obrębie nosa, 7% w obrębie oczodołu – spośród wszystkich przypadków). Często zajmuje też okolice ucha – ok. 6% [10].

Rak płaskonabłonkowy (kolczystokomórkowy) o etiologii HPV

Nowotwór ten wywodzi się z keratynizujących komórek naskórka. Charakteryzuje go szybki, gwałtowny wzrost, naciekanie miejscowych struktur oraz tendencja do przerzutów odległych (3–5%). Oprócz HPV czynnikami etiologicznymi mogą być promieniowanie słoneczne oraz transformacja zmian łagodnych. Rak przyjmuje postać guzka, grudki lub tarczki, pokrytej strupami. Z czasem wrzodzieje i nacieka tkanki położone pod nim. Główną lokalizacją tego nowotworu stanowi twarz, szczególnie nos [10, 52].

Rak brodawkujący

Rak brodawkujący stanowi rzadką odmianę raka kolczystokomórkowego. Zmiana ta cechuje się łagodnym przebiegiem, stosunkowo niskim ryzykiem naciekania węzłów chłonnych i tworzeniem przerzutów odległych. W materiale histopatologicznym potwierdzono obecność następujących typów HPV: 1, 2, 3, 4, 6, 11,16, 18, 31, 33, 35. Obecność HPV 16 i 18 potwierdzono w ok. 40% tych nowotworów. Zmiany są najczęściej zlokalizowane na policzkach oraz dziąsłach, jednak mogą występować w każdym miejscu zarówno skóry jak i błon śluzowych, nie wyłączając układu oddechowego oraz pokarmowego. Rak przyjmuje postać guza, składającego się z warstwy endofitycznej i egzofitycznej, przypominającego brodawkę o etiologii wirusowej. Wewnątrz mas nowotworu stwierdza się zróżnicowane komórki kolczyste, krypty oraz zatoki, powstałe na skutek martwicy [4].

Leukoplakia

Terminem leukoplakia określa się białą zmianę (tarczkę lub plamkę) na błonie śluzowej, której nie można przyporządkować do żadnej innej choroby.

Najczęstszym umiejscowieniem leukoplakii jest błona śluzowa policzków, na poziomie zgryzu zębów. Nowotwór może przybierać różne formy morfologiczne o różnej wielkości; od małych do dużych, rozległych zmian. Także barwa wykazuje zróżnicowanie (od białej po szarą i czerwono-białą). Oprócz HPV wirusy takie jak EBV, HSV czy HIV mogą być czynnikiem etiologicznym. Patogeny te wpływają także na transformację nowotworową. Uważa się, że obecność HPV jest 2–3 razy częstsza w zmianach przednowotworowych jamy ustnej (takich jak np. leukoplakia) niż w zdrowej jamie ustnej [19, 42].

Rak migdałków

Migdałki, znajdujące się na granicy środowiska zewnętrznego oraz wewnętrznego naszego organizmu, stanowią pierwszą linię obrony przed czynnikami infekcyjnymi dostającymi się z jamy ustnej do wnętrza organizmu, stąd częste występowanie tego typu raka (najwyższy odsetek raków gardła o etiologii HPV). Nowotwór ten, w przeciwieństwie do HPV – częściej wywodzi się z krypt nabłonka, co z anatomicznego punktu widzenia sprzyja rozwojowi wirusa [29, 45].

Odwrócony brodawczak nosa

Ten łagodny nowotwór jest wywołany najczęściej w wyniku zakażenia wirusami typu 6, 11, 16, 18. W 25% przypadków pobranego ze zmiany materiału histopatologicznego stwierdza się obecność HPV. Zazwyczaj jednostronny, wywodzi się z nabłonka błony śluzowej zatok przynosowych oraz nosa. Około 3 razy częściej chorują mężczyźni, zazwyczaj w wieku 40–60 lat. Istnieje ryzyko transformacji do postaci złośliwej a także skłonność do nawrotów, mieszcząca się w przedziale 20–47% (zwłaszcza u chorych zainfekowanych HPV) [12].

Oprócz wymienionych i omówionych schorzeń do nowotworów głowy i szyi spowodowanych infekcją HPV możemy zaliczyć również: brodawczaka zatoki szczękowej, hiperplazję płaskonabłonkową, kłykciny kończyste jamy ustnej, *epidermodysplasia verruciformis*, z którym związane są HPV 5, 9 i 49 [25, 45]. Typ 32 często odpowiada za rzadkie, łagodne schorzenie FEH- ogniskową hiperplazję nabłonkową [46]. Jednakże, dane zawarte w piśmiennictwie są niewystarczające, aby określić rolę wirusa jako czynnika prognostycznego i predykcyjnego we wspomnianych wyżej nowotworach.

6. Leczenie

Do standardów terapeutycznych w przypadku infekcji HPV możemy zaliczyć: cidofovir (skuteczny np. w brodawczakowatości dróg oddechowych) [39], cetuximab [17, 22, 58] i interferon alfa [71]. Oprócz tego stosuje się również radioterapię [17], chemioterapię [58] lub krioterapię (brodawczaki) [71].

W 2014 roku Vermorken i wsp. poddali ocenie skuteczność leczenia HNSCC HPV (+) i HPV (–) chemioterapią oraz skojarzoną chemioterapią z cetuximabem. Wykazano, że niezależnie od statusu HPV oraz genu p16 korzystne jest łączenie klasycznej chemioterapii z cetuximabem [58].

Rok później przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych na myszach. Testowano połączenie radioterapii z onkologicznymi szczepionkami w przypadku nowotworów głowy i szyi HPV pozytywnych. Rezultaty były pomyślne, co dało możliwość rozpoczęcia dalszych badań klinicznych [36].

W 2016 roku wykazano, że DAC-5-aza-2'-deoksycytydyna silnie hamuje ekspresję E6 oraz E7, odpowiadających za transformację nowotworową. Zaobserwowano, że lek zmniejsza także szybkość proliferacji komórek nowotworowych [53].

7. Szczepionki

W 2015 roku na rynku farmaceutycznym pojawiła się 9-walentna szczepionka przeciw HPV (Gardasil-9, chroniąca przed typami 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 oraz 58, charakteryzująca się najszerszym spectrum działania [43, 47].

Oprócz tej szczepionki zarejestrowane są jeszcze dwie: 2-walentna (zatwierdzona w 2007 roku, przeciwko 16 oraz 18, stosowana jedynie u kobiet) [43] oraz 4-walentna (zatwierdzona w 2006 roku, przeciwko typom 6, 11, 16, 18). Szczepionka 4-walentna o objętości 0,5 ml zawiera po 20 μg z L1 HPV typu 6 oraz 18 i po 40 μg z L1 HPV typu 11 oraz 16. Natomiast szczepionka biwalentna, w tej samej dawce zawiera po 20 μg L1 z typów 16 oraz 18. Obie nie posiadają wirusowego DNA ani żywych produktów wirusowych, za to zawierają oczyszczone białko L1. Każdą z nich należy podawać w trzech dawkach [26].

Zaleca się je osobom w wieku 11 i 12 lat, a także w wieku 13–21 lat (u mężczyzn) oraz 13–26 lat (u kobiet), jeżeli wcześniej szczepienia nie były wykonane. Dopuszcza się pierwsze szczepienie już w wieku 9 lat. Do 26 roku życia powinni szczepić się też mężczyźni z obniżoną odpornością lub osoby utrzymujące homoseksualne stosunki płciowe [16, 43].

Nie zaleca się stosowania szczepionek u kobiet w ciąży, u osób z natychmiastową nadwrażliwością na drożdże (4 i 9 walentna) oraz z alergią na lateks (biwalentna) [43]. Badane są również szczepionki w oparciu o użycie L2 wirusa HPV [26].

Według ostatnich badań z 2017 roku, w których uczestniczyło 361 kobiet w wieku od 20 do 25 lat, częstość występowania HPV typu 16 wśród kobiet szczepionych była znacznie niższa w stosunku do tych, które nie otrzymały żadnego preparatu (8,6% do 46,7%) [38].

8. Podsumowanie

Wirus brodawczaka ludzkiego jest groźnym patogenem atakującym nie tylko narządy płciowe człowieka [34] lecz także tkankę nabłonkową głowy oraz szyi, powodując powstawanie wielu jednostek chorobowych, w tym raków. Należy podkreślić, że liczbę zakażeń HPV u ludzi szacuje się na poziomie ponad 700 mln. Szczególnie narażone na zakażenie są osoby o obniżonej odporności oraz ze współistniejącą infekcją *C. trachomatis*. Do metod profilaktycznych możemy zaliczyć unikanie ryzykownych zachowań seksualnych oraz stosowanie szczepionek. Wielu badaczy jednoznacznie podkreśla, że szczepienie stanowi ważny czynnik w prewencji infekcji. Nowotwory HPV (+) charakteryzują się korzystniejszym rokowaniem, niż te HPV (–), co potwierdzają liczne badania [18, 45].

Piśmiennictwo

1. Abramson A.L., Steinberg B.M., Winkler B.: Laryngeal papillomatosis: clinical, histopathologic and molecular studies. *Laryngoscope*, **97**, 678–685 (1987)
2. Ault K.A.: Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 1–5 (2006)
3. Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z., van Doorslaer K., zur Hausen H., de Villiers E.M.: Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, **401**, 70–79 (2010)
4. Bieniek A., Cisło M., Matusiak Ł., Woźniak Z., Maj J., Barancewicz-Łosek M., Szybejko-Machaj G.: Rak brodawkujący (carcinoma verrucosum) – przegląd objawów klinicznych i histologicznych. *Post. Dermatol. Alergol.* **23**, 57–66 (2006)
5. Bodaghi S., Wood L.V., Roby G., Ryder C., Steinberg S.M., Zheng Z.M.: Could human papillomaviruses be spread through blood? *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5428–5434 (2005)
6. Broniarczyk J., Koczorowska M.M., Durzyńska J., Warowicka A., Goździcka-Józefiak A.: Struktura i właściwości wirusa brodawczaka ludzkiego. *Biotechnol.* **3**, 126–145 (2010)
7. Brzeziński P.: Choroba Bowena leczona przez trzy lata jako kontaktowe zapalenie skóry. *Forum Medycyny Rodzinnej*, **5**, 266–270 (2011)
8. Cantrell S.C., Reid H.H., Li G., Wei Q., Sturgis E.M., Ginsberg L.E.: Influence of Smoking History on Imaging Characteristics among HPV-Positive Oropharyngeal Cancer Patients: A Blinded Matched-Pair Analysis. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **38**, 667 (2014)
9. Centers for Disease Control and Prevention: Cdc.gov/ Hpv [23-03-2017]
10. Chicheł A., Skowronek J.: Współczesne leczenie raka skóry – dermatologia, chirurgia czy radioterapia? *Contemp. Onkol.* **9**, 429–435 (2005)
11. Chouhy D., Bolatti E.M., Perez G.R., Giri, A.A.: Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *J. Gen. Virol.* **94**, 2480–2488 (2013)
12. Cielińska M., Ścierski W., Sowa P., Lisowska G.: Brodawczak odwrócony – etiologia, epidemiologia, klasyfikacja. *Otorynolaryngologia*, **15**, 80–86 (2016)
13. Corbitt G., Zarod A.P., Arrand J.R., Longson M., Farrington W.T.: Human papillomavirus (HPV) genotypes associated with laryngeal papilloma. *J. Clin. Pathol.* **41**, 284–288 (1988)
14. de Villiers E.M.: Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, **445**, 2–10 (2013)
15. Donne A.J., Clarke R.: Recurrent respiratory papillomatosis: an uncommon but potentially devastating effect of human papillomavirus in children, *Int. J. STD AIDS*, **21**, 381–385 (2010)
16. Dunne E.F., Markowitz L.E., Saraiya M., Stokley S., Middleman A., Unger E.R., Wiliams A., Iskander J.: CDC grand rounds: reducing the burden of HPV-associated cancer and disease. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **63**, 69–72 (2014)
17. Eriksen J.G., Lassen P., Overgaard J.: Do all patients with head and neck cancer benefit from radiotherapy and concurrent cetuximab? *Lancet Oncol.* **11**, 312–313 (2010)
18. Fakhry C., Gillison M. i wsp.: Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **32**, 3365–3373 (2014)
19. Feller L., Lemmer J.: Oral leukoplakia as it relates to HPV infection: a review. *Int. J. Dent.* DOI:10.1155/2012/540561 (2012)
20. Giroglou T., Florin L., Schäfer F., Streeck R. E., Sapp M.: Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate, *J. Virol.* **75**, 1565–1570 (2001)
21. Gissmann L., Diehl V., Schultz-Coulon H.J., Zur Hausen H.: Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J. Virol.* **44**, 393–400 (1982)
22. Griego A.M., Ozbun M.A., Barraza P.F., Hu C., Dziduszko A., Crawley B.K., Hathaway H.J., Bauman J.E.: Cetuximab Has Antiviral Activities in Human Papillomavirus (HPV) – Infected Cells and HPV – Associated Tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **94**, 937–938 (2016)
23. Guan X., Sturgis E. M., Lei D., Liu Z., Dahlstrom K.R., Wei Q., Li G.: Association of TGF-β1 genetic variants with HPV16--positive oropharyngeal cancer. *Clinical Cancer Research*, **16**, 1416–1422 (2010)
24. Hirnle L.: Przypadek infekcji wirusem HPV kobiety oraz jej dziecka urodzonego drogą cięcia cesarskiego. *Przypadki medyczne.pl*, **36**, 149–153 (2013)
25. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna--viruses-2011/w/dsdna_viruses/121/papillomaviridae [23-03-2017]
26. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014, *Wkly Epidemiol. Rec. WHO*, **89**, 465–492 (2014)
27. Jurkiewicz D., Dżaman K., Rapiejko P.: Czynniki ryzyka raka krtani. *Pol. Merk. Lek.* **121**, 94–98 (2006)
28. Kashima H., Leventhal B., Mounts P., Hruban R.H. Sites of predilection in recurrent respiratory papillomatosis, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **102**, 580–583 (1993)
29. Kiwerska K., Mielcarek-Kuchta D., Jarmuż-Szymczak M., Szyfter K.: Infekcja HPV jako alternatywna wobec palenia tytoniu droga rozwoju nowotworów głowy i szyi – jakie ma znaczenie dla pacjenta? *Przegl. Lek.* **69**, 1074–178 (2012)
30. Koparal M., Alan H., Gunduz D.T., Gulsun B., Unsal H.Y., Erdogdu H.I.: Human papilloma virus. *Journal of Turgut Ozal Medical Center,* **23**, 353–356 (2016)
31. Lagatie O., Tritsmans L., Stuyver L.J.: The miRNA world of polyomaviruses. *Virology*, **10**, 268 (2013)
32. Liu T., Wentland C., Greenberg M., Sepe B., Huynh T., Kodack D., Mino-Kenudson M., Benes C., Hartnick C., Engelman J.: Detection of PD-L1 and lymphocytes infiltration in Juvenile Recurrent Respiratory Papillomatosis (JRRP*). Cancer Immunology Research*, **5**, DOI: 10.1158/2326-6074 (2017)
33. Louvanto K., Sarkola M., Rintala M., Syrjänen K., Grenman S., Syrjänen S.: Breast milk is a potential vehicle for HPV

transmission to oral mucosa of the spouse. *Pediat. Infect. Dis. J.* DOI: 10.1097/INF.0000000000001546 (2017)
34. Majewski S., Pniewski T., Goyal-Stec M.: Rola wirusów brodawczaka w rozwoju zmian łagodnych i złośliwych okolicy narządów płciowych. *Zakażenia*, **6**, 58–62 (2005)
35. Mohr M., Berdel W. E. i wsp.: Rapid response to systemic bevacizumab therapy in recurrent respiratory papillomatosis. *Oncol. Lett.* **8**, 1912–1918 (2014)
36. Mondini M., Deutsch E. i wsp.: Synergy of radiotherapy and a cancer vaccine for the treatment of HPV-associated head and neck cancer. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 1336–1345 (2015)
37. Morshed K.: Udział wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) w etiopatogenezie nowotworów głowy i szyi. *Otolaryngol.* **3**, 91–96 (2004)
38. Munro A., Cruickshank M.E. i wsp.: The impact of HPV type on colposcopy performance in women offered HPV immunisation in a catch-up vaccine programme: a two centre observational study. *BJOG*, DOI: 10.1111/1471-0528.14563 (2017)
39. Nowaczewska K., Wójtowicz P., Kukwa A., Ratajczak J., Tulibacki M.: Brodawczaki górnych dróg oddechowych – nowe metody leczenia. *Otolaryngol. Pol.* **64**, 31–36 (2010)
40. Parfenov M., Kucherlapati R. i wsp.: Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 15544–15549, (2014)
41. Petito G., dos Santos Carneiro M.A., de Rabello Santos S.H., Silva A.M.T.C., de Cassia Alencar R., Gontijo A.P., Saddi V.A.: Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **83**, 38–44 (2016)
42. Petkowicz B., Skiba M., Tomaszewski T., Wysokińska-Miszczuk J.: Leukoplakia błony śluzowej jamy ustnej w aspekcie klinicznym i epidemiologicznym – analiza przypadków. *Dent. Med. Probl.* **41**, 635–641 (2004)
43. Petrosky E., Bocchini Jr J.A., Hariri S., Chesson H., Curtis C.R., Saraiya M., Unger E.R., Markowitz L.E.: Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **64**, 300–304. (2015)
44. Piłat P., Borzęcki A., Krasowska D.: Rozległa choroba Bowena twarzy – leczenie skojarzone. *Przegl. Dermatol.* **101**, 201–204 (2014)
45. Rutkowski T., Składowski K.: Wpływ wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) na powstanie, przebieg i skuteczność leczenia raków regionu głowy i szyi. *Współcz. Onkol.* **13**, 233–240 (2009)
46. Sabeena S., Pallade S.R., Kamath N., Mathew M., Arunkumar G.: Papilloma of lip associated with human papilloma viruses-32 infection in a child. *Indian J. Med. Microbiol.* **34**, 97 (2016)
47. Santarelli G.D., Derkay, C.S.: HPV vaccines for treatment and prevention of recurrent respiratory papillomatosis. *Current Otorhinolaryngology Reports*, **4**, 85–89 (2016)
48. Schiffman M., Castle P.E.: Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **127**, 930–934 (2003)
49. Schiller J.T., Day P.M., Kines R.C.: Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol. Oncol.* **118**, 12–17 (2010)
50. Sinal S.H., Woods C.R.: Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **16**, 306–316 (2005)
51. Smith E.M., Ritchie J.M., Summersgill K.F., Klussmann J.P., Lee J. H., Wang D., Haugen T.H., Turek L.P.: Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int. J. Cancer*, **108**, 766–772 (2004)
52. Smith E.M., Summersgill K.F., McCulloch T., Allen J., Turek L.P., Hoffman H.T., Haugen T.H.: Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **109**, 1069–1076 (2000)
53. Stich M., Ganss L., Puschhof J., Prigge E.S., Reuschenbach M., Guiterrez A., Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M.: 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) treatment downregulates the HPV E6 and E7 oncogene expression and blocks neoplastic growth of HPV-associated cancer cells. *Oncotarget*, DOI: 10.18632/oncotarget.10631 (2016)
54. Symer D.E., Akagi K., Coombes K.R., Xiao W., Pickard R.K., Agrawal A., Gillison M.L.: Comprehensive genomic analysis of human papillomavirus-associated oral cancers. *AACR,* DOI: 10.1158/1538-7445 (2016)
55. Szczerba-Turek A., Szweda W., Siemionek J., Platt-Samoraj A., Bancerz-Kisiel A., Teodorowski P.: Molekularne mechanizmy nowotworzenia *Papillomaviridae* u zwierząt i ludzi. *Med. Wet.* **63**, 1045–1048 (2007)
56. Tay S.K., Ho T.H., Lim-Tan S.K.: Is genital human papillomavirus infection always sexually transmitted?, *Aust. N.Z.J. of Obstet. Gynaecol.* **30**, 240–242 (1990)
57. Van Doorslaer K.: Evolution of the papillomaviridae. *Virology*, **445**, 11–20 (2013)
58. Vermorken J.B., Psyrri A., Mesia R., Peyrade F., Beie F., De Blas B., Celik I., Licitra L.: Impact of tumor HPV status on outcome in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck receiving chemotherapy with or without cetuximab: retrospective analysis of the phase III EXTREME trial. *Ann. Oncol.* **25**, 801–807 (2014)
59. ViralZone.expasy.org/ Betapapillomavirus [23-03-2017]
60. ViralZone.expasy.org/ Epsilonpapillomavirus [23-03-2017]
61. ViralZone.expasy.org/Gammapapillomavirus [23-03-2017]
62. ViralZone.expasy.org/Lambdapapillomavirus [23-03-2017]
63. ViralZone.expasy.org/Mupapillomavirus [23-03-2017]
64. ViralZone.expasy.org/Nupapillomavirus [23-03-2017]
65. Wardak S.: Wirus brodawczaka ludzkiego (Human Papilloma Virus-HPV) a rak szyjki macicy. Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **68**, 73–84 (2016)
66. Westra W.H.: The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol.* **3**, 78 (2009)
67. World Health Organization: Who.int/ Human papillomavirus and cervical cancer [23-03-2017]
68. Wiciński M., Malinowski B., Grześk E., Szadujkis-Szadurska K., Czeczuk A., Michalska A., Klonowska J., Wójtowicz-Chomicz K., Ostrowska J., Stolarek W., Grześk G.: Czynniki biologiczne w etiopatogenezie schizofrenii. *Post. Mikrobiol*. **53**, 328–334 (2014)
69. Wiciński M., Sopońska P. Brzoszczyk B., Malinowski B., Michalska A., Grześk E., Szadujkis-Szadurska K., Kornatowski T., Czeczuk A., Grześk G.: Udział ludzkiego cytomegalowirusa w mechanizmach karcynogenezy glejaka wielopostaciowego. *Post. Mikrobiol.* **52**, 355–361 (2013)
70. Wiciński M., Sopońska P., Brzoszczyk B., Malinowski B., Grześk E., Michalska A.: Rola czynników zakaźnych w chorobach neurodegeneracyjnych. *Post. Mikrobiol.* **52**, 93–103 (2013)
71. Yıldırım F., Türk M., Demircan S., Akyürek N., Yurdakul A.S.: Tracheal papilloma treated with cryotherapy and interferon-α: a case report and review of the literature. *Case Rep. Pulmonol.* DOI: 10.1155/2015/356796 (2015)
72. Zheng Z.M., Baker C.C.: Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci.* **11**, 2286 (2006)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 41–46
http://www.pm.microbiology.pl

GORĄCZKI POWROTNE

Stanisława Tylewska-Wierzbanowska, Beata Fiecek, Tomasz Chmielewski*

Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w październiku, zaakceptowano w listopadzie 2017 r.

Streszczenie: Gorączki powrotne zaliczane są z jednej strony do nowych bądź nawracających chorób zagrażających człowiekowi z drugiej strony nadal należą do chorób zaniedbywanych, które przyciągają niewielką uwagę badaczy i opinii publicznej w krajach rozwiniętych. Rodzaj *Borrelia* dzieli się na dwie duże grupy. Do pierwszej z nich należą krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato, wywołujące boreliozę z Lyme, po raz pierwszy wyizolowane z kleszczy *Ixodes dammini*. Druga duża grupa krętków rodzaju *Borrelia* zawiera ponad 20 gatunków związanych z gorączkami powrotnymi, które przenoszone są głównie przez miękkookrywowe kleszcze, z wyjątkiem *B. recurrentis* przenoszonej przez wszy. Porównując DNA różnych gatunków w obrębie tego rodzaju, okazało się, że podobieństwo pomiędzy nimi często jest niewielkie i np. podobieństwo sekwencji DNA *B. miyamotoi* z *B. burgdorferi* s.s. i *B. garinii* wynosi 13%, a z *B. afzelii* 8%. Podobieństwo DNA *B. miyamotoi* z przedstawicielami grupy gorączek powrotnych przenoszonych przez kleszcze, jest bliższe i wynosi z *B. hermsii* – 4%, *B. turicatae* – 41% i *B. parkeri* 51%. Objawy gorączek powrotnych przenoszonych przez wszy oraz przez kleszcze są bardzo podobne. Dla obu rodzajów gorączek powrotnych charakterystyczna jest nagła, wysoka gorączka, z dreszczami, silnym bólem głowy, bólami mięśni i stawów, ospałością, światłowstrętem i kaszlem.

1. Wprowadzenie 2. Systematyka – klasyfikacja 3. Objawy kliniczne 4. Podsumowanie

Relapsing fevers

Abstract: Relapsing fevers are considered, on the one hand, emerging or re-emerging diseases, and on the other hand, they still belong to neglected diseases which attract little attention of researchers and the public in developed countries. Genus *Borrelia* is divided into two large groups. The first of these is *Borrelia burgdorferi* sensu lato – the etiologic agent of Lyme disease, first isolated from the *Ixodes dammini* tick. The second large group of *Borrelia* spirochetes contains more than 20 species associated with relapsing fever, which are mainly transmitted by soft ticks, with the exception of *B. recurrentis* transmitted by lice. Comparision of the DNA of different species within this genus showed that the similarity between them is often small, e.g. the DNA homology between *B. miyamotoi* and *B. burgdorferi* s.s. or *B. garinii* is 13%, and *B. afzelii* only 8%, whereas the *B. miyamotoi* DNA has a profile similar to the representatives of the tick-borne relapsing fevers, such as *B. hermsii* (44%), *B. turicatae* (41%), *B. Parkeri* (51%). Symptoms of relapsing fevers transmitted by lice and by ticks are very similar. The following symptoms are characteristic for both types of relapsing fevers: high fever with sudden onset, chills, severe headache, muscle and joint pain, drowsiness, photophobia and cough.

1. Introduction. 2. Systematics – classification. 3. Clinical symptoms. 4. Summary

Słowa kluczowe: *Borrelia, gorączki powrotne*
Key words: *Borrelia, relapsing fevers*

1. Wprowadzenie

Czynnikiem etiologicznym gorączek powrotnych są różne gatunki krętków rodzaju *Borrelia.* Powszechnie, rodzaj *Borrelia*, chociaż obejmuje bardzo dużą grupę krętków o znacznej różnorodności, kojarzy się przede wszystkim z boreliozą z Lyme. Borelioza z Lyme wywoływana jest przez grupę krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato, natomiast gorączki powrotne przenoszone przez kleszcze lub wesz ludzką stanowią odrębną grupę w skład której wchodzi około 20 gatunków krętków [30].

Wzorcowym gatunkiem dla rodzaju *Borrelia* był krętek *B. anserina*, przenoszony przez miękkookrywowe kleszcze rodzaju *Argas*, przede wszystkim *A. persulcatus*. Jako pierwszy opisał ten rodzaj krętków francuski badacz Amedee Borrel (1867–1936), który porównując je ze znanymi w tym czasie krętkami, *Treponema pallidum*, opisał znaczące różnice w ich morfologii. Chociaż przypisywany tym krętkom układ peritrychalny rzęsek, był nieprawdziwy, dla uhonorowania autora pierwszego opisu nowego rodzaju krętków, nadano im nazwę pochodzącą od jego nazwiska – *Borrelia*. Obecnie gatunek *B. anserina* występuje rzadko. Jest on chorobotwórczy dla różnych gatunków ptaków i może powodować ogromne straty w fermach drobiu. Ptaki zarówno, domowe, jak np. kury, indyki, kaczki oraz dzikie ptaki łowne – bażanty, kuropatwy, są głównym gospodarzem tego gatunku. Między ptakami krętki przenoszone są przez kleszcze rodzaju *Argas*. Patogen ten obecnie stanowi problem głównie w Afryce Saharyjskiej, a także w innych krajach rozwijających się [13, 30].

Gorączki powrotne przenoszone przez kleszcze wywoływane są przez co najmniej 15 gatunków krętków rodzaju *Borrelia* chorobotwórczych dla człowieka

* Autor korespondencyjny: Dr hab. n. med. Tomasz Chmielewski, prof. nadzw. NIZP-PZH, Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 542 12 61; e-mail: tchmielewski@pzh.gov.pl

i są przenoszone na ludzi przez różne gatunki kleszczy rodzaju *Ornithodoros*. Rezerwuarem krętków odpowiedzialnych za gorączki powrotne są gryzonie i inne małe zwierzęta, jak myszy, szczury, wiewiórki, króliki oraz jaszczurki i sowy.

Gorączki powrotne zaliczane są z jednej strony do nowych bądź nawracających chorób zagrażających człowiekowi (emerging, re-emerging diseases) z drugiej strony nadal należą do chorób zaniedbywanych (neglected diseases), które przyciągają niewielką uwagę badaczy i opinii publicznej w krajach rozwiniętych. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w krajach o niskim i średnim poziomie ekonomicznym i sanitarnym, głównie w ubogich regionach tropikalnych, gorączki powrotne są bardzo częstymi zachorowaniami, a w ich następstwie dochodzi do przewlekłej niepełnosprawności. Jak ostrzega WHO, choroby wywoływane przez te krętki mogą wkrótce wystąpić na całym świecie i dlatego należy je ograniczać, między innymi przez szeroko pojętą profilaktykę. Dotychczasowe zaniedbania muszą zostać zlikwidowane. Najczęściej zaniedbywane choroby zakaźne są powodowane lub rozprzestrzeniane przez owady i inne stawonogi, których kontrola jest trudna i kosztowna. Jednak w przypadku wszystkich tych wektorów działanie kontrolne jest podobne, dzięki czemu lepsza koordynacja działań może poprawić skuteczność ich działań.

2. Systematyka – klasyfikacja

Na podstawie analizy sekwencji rRNA DNA i innych konserwatywnych genów (np.: *fla, hbb*) ustalono, że rodzaj *Borrelia* dzieli się na dwie duże grupy (Tabela I).

Do pierwszej z nich należą krętki wywołujące boreliozę z Lyme, po raz pierwszy wyizolowane z kleszczy

Tabela I
Systematyka i cechy charakterystyczne krętków rodzaju *Borrelia*

Kompleks/grupa	Gatunek / Genogatunek	Wektor	Wywoływana choroba	Występowanie
B. burgdorferi sensu lato	*B. burgdorferi* sensu stricto	*Ixodes* spp.	Borelioza z Lyme	USA, Europa, Azja
	B. afzelii			Europa
	B. garinii			Europa, Azja
Grupa gorączek powrotnych	*B. recurrentis*	*Pediculus humanus*	Gorączka powrotna przenoszona przez wszy	Ameryka Płd., Europa, Afryka, Azja
	B. anserina	*Argas* spp.	Borelioza ptasia	Cały świat
	B. brasiliensis	*Ornithodoros brasiliensis*	nieznana	Brazylia
	B. tillae	*O. zumpti*	nieznana	Płd. Afryka
	B. coriaceae	*O. coriaceus*	Epizootyczne ronienie bydła	USA
	B. baltazardii	nieznany	Gorączki powrotne przenoszone przez kleszcze miękkie	Iran
	B. caucasica	*O. verrucosus*		Kaukaz
	B. croicidurae	*O. sonrai*		Afryka, Bliski Wschód, Centralna Azja
	B. dugesii	*O. dugesii*		Meksyk
	B. duttonii	*O. moubata*		Afryka
	B. graingeri	*O. graingeri*		Wsch. Afryka
	B. harveyi	nieznany		Afryka
	B. hermsii	*O. hermsi*		Zach. USA, Kanada
	B. hispanica	*O. erraticus*		Hiszpania, Portugalia, Maroko, Algieria
	B. latyschewii	*O. tartakov*		Iran, Centralna Azja
	B. mazzotti	*O. tulaje*		Meksyk, Gwatemala
	B. parkeri	*O. parkeri*		Zach. USA
	B. persica	*O. tholozani*		Śr. Wschód, Centralna Azja
	B. turicatae	*O. turicatae*		USA, Meksyk
	B. venezuelensis	*O. rudis*		Ameryka Śr.
	B. miyamotoi[1]	*Ixodes persulcatus*, *I. ricinus, I. dammini*	Borelioza Miyamotoi	Japonia, Azja, Europa, USA
	B. theileri[1]	*Rhipicephalus evertsi*	Borelioza bydlęca	Płd. Afryka, Australia

[1] gorączki powrotne przenoszone przez kleszcze twardookrywowe

Ixodes dammini. W skład jej wchodzą trzy chorobotwórcze dla człowieka genogatunki: *B. burgdorferi*, *B. afzelii* i *B. garinii* oraz kilkanaście genogatunków potencjalnie chorobotwórczych, takich jak *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica*, *B. spielmanii* i *B. valesiana*). Wszystkie krętki należące do tej grupy przenoszone są przez twardookrywowe kleszcze rodzaju *Ixodes* i należą do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato [5, 6].

Druga duża grupa krętków rodzaju *Borrelia* zawiera ponad 20 gatunków związanych z gorączkami powrotnymi, które przenoszone są głównie przez miękkookrywowe kleszcze, z wyjątkiem *B. recurrentis* przenoszonego przez wszy [2, 6].

Poszczególne gatunki tych krętków związane są ściśle z określonym przenosicielem (wektorem). Uznano, że bakterie te wykazują wysoką swoistość i powinowactwo do swojego wektora, jeden gatunek – jeden wektor [13]. W związku z tym podzielono je wraz z wywoływanymi przez nie chorobami na dwie grupy: gorączka powrotna przenoszona przez wszy, z jednym przedstawicielem: *Borrelia recurrentis*, przenoszonym przez wesz odzieżową (*Pediculus humanus*) oraz druga grupa, gorączki powrotne przenoszone przez kleszcze, z wieloma gatunkami, przenoszonymi przez miękkookrywowe kleszcze rodzaju *Argas* i *Ornithodordoros* [6, 13, 30]. Najlepiej poznanym, wzorcowym gatunkiem w tej grupy jest *Borrelia hermsii*.

Stwierdzono, że w przypadku gorączki powrotnej przenoszonej przez wszy, po pobraniu przez wesz krwi człowieka zakażonego krętkami *Borrelia recurrentis*, bakterie penetrują jelito owada, przenikają do jego hemolimfy i namnażają się. Zakażenie jednak nie jest przenoszone wraz ze śliną wszy na kolejnego żywiciela, ani transowarialnie na jej potomstwo. Jedynym źródłem zakażenia dla człowieka jest rozgnieciona, zakażona wesz, z której w ten sposób uwalniają się krętki, mające zdolność przenikania przez nieuszkodzoną skórę i błony śluzowe. Gorączki powrotne przenoszone przez wszy szerzą się epidemicznie i związane są zazwyczaj ze zdarzeniami katastroficznymi, takimi jak wojny lub klęski głodu, które prowadzą do przemieszczania się ludzi, powodując nadmierne zatłoczenie w pewnych rejonach i rozprzestrzenianie się wszawicy. Ostatnia, wielka epidemia wystąpiła podczas II wojny światowej i obejmowała północną Afrykę i Europę. Szacuje się, że w jej wyniku zmarło około 50 tysięcy ludzi [30]. Obecnie, gorączka przenoszona przez wszy występuje endemicznie na wyżynach centralnej i wschodniej Afryki (Etiopia, Sudan, Somalia, Czad) oraz w Południowej Ameryce, w Andach (Boliwia, Peru).

Zastosowanie metod molekularnych pozwoliło na ocenę stopnia pokrewieństwa pomiędzy izolowanymi szczepami rodzaju *Borrelia* i różnicowanie grup gorączek powrotnych. Porównując DNA różnych gatunków krętków w obrębie tego rodzaju, okazało się, że podobieństwo pomiędzy nimi często jest niewielkie i np. podobieństwo sekwencji DNA *B. miyamotoi* z *B. burgdorferi* sensu stricto i *B. garinii* wynosi 13%, a z *B. afzelii* 8%. Umiarkowane podobieństwo DNA *B. miyamotoi* wykazuje także z przedstawicielami grupy gorączek powrotnych przenoszonych przez kleszcze, takimi jak np.: *B. hermsii* (44%), *B. turicatae* (41%), *B. parkeri* (51%) [2, 22]. Badania te wskazują na istnienie odrębnych grup gorączek powrotnych przenoszonych, np. przez twardookrywowe kleszcze, różniących się pewnymi cechami od grupy gorączek powrotnych przenoszonych przez kleszcze miękkie *Argasida* [1, 7, 14, 17, 18, 21, 26].

W związku z tym proponowane jest utworzenie trzeciej grupy gorączek powrotnych.

Badania molekularne krętków izolowanych z kleszczy zainicjowało w ostatnich latach zmiany, w niektórych bowiem przypadkach ponownie wykryto zapomniane już gatunki, jak np. *B. merionesi*, występujące w północnej Afryce, opisano nowe gatunki, jak *B. miyamotoi*. Ponadto proponowani są kolejni kandydaci nowych gatunków: *Candidatus B. johnsonii*, *B. lonestari*, *B. mvumii* i *B. texasensis* W.D. Johnson Jr. [30].

Niewiele jest publikacji, opisujących nowe krętki z grupy gorączek powrotnych, zawierających dane na temat ich chorobotwórczości i rozpowszechnienia. Badając we Francji nietoperze bytujące na budynkach mieszkalnych i pasożytujące na nich kleszcze *Argas vespertilionsis*, stwierdzono obecność krętków *Borrelia* spp. wywołujących gorączkę powrotną [27]. Były one bardzo podobne do krętków występujących także w Wielkiej Brytanii, które były tam przyczyną wielu ciężkich zakażeń, w tym przypadków śmiertelnych [8].

Coraz częściej zwraca się uwagę na występowanie gorączek powrotnych u zwierząt hodowlanych oraz dziko żyjących. Uważa się, że opisywane obecnie zakażenia *B. theileri***,** można traktować jako ponownie odkryte [1, 2]. Zakażenia te mające ogromne znaczenie w weterynarii, występują w rejonach gdzie możliwości diagnostyczne są ograniczone i dlatego wpływ ich na produkcję zwierzęcą nie jest zbadany [10]. Ponadto, ten gatunek krętka chociaż związany jest z gorączką powrotną, przenoszony jest przez kleszcze twardookrywowe z rodzaju *Rhipicephalus*. Filogenetycznie zbiór szczepów (ang.: *cluster*) *B. theileri* jest blisko spokrewniony z innym przenoszonym przez kleszcze twarde, przedstawicielem gorączek powrotnych, opisanym w Stanach Zjednoczonych, gatunkiem *B. lonestari*, który przenoszony jest przez *Amblyomma americanum* i inne gatunki kleszczy twardych. *B. lonestari* jest związany z ludzkimi zmianami skórnymi występującymi po ukłuciu przez kleszcza [14]. Niedawno drobnoustrój podobny do *B. lonestari* został opisany w kleszczach *Haemaphysalis* i u wschodniego jelenia sika (*Cervus nippon yesoensis*) w Japonii, co sugeruje, że gatunek ten ma znacznie bardziej globalne rozprzestrzenienie

niż wcześniej sądzono [31]. Podobnie, w Portugalii wykryto dwie blisko spokrewnione podgrupy rodzaju *Borrelia* wywołujących gorączki powrotne, bytujące w kleszczach *Haemaphysalis punctata* i *Rhipicephalus sanguineus* [23]. Ponieważ gatunki te zostały wykryte także w kleszczach *Argas* spp. obserwacje te obalają istniejącą zasadę podziału krętków na przenoszone przez kleszcze miękko- i twardookrywowe.

Poszukując szczepów w kolekcji ATCC lub deponując sekwencje w GenBanku, można spotkać proponowany nowy rodzaj, wydzielony w rodzaju *Borrelia*, klasyfikowany jako *Borreliella*. Ta zaproponowana terminologia wynika z analizy połączonych danych opisujących sekwencje 25 białek i kodujących je genów w 38 szczepach rodzaju *Borrelia*, reprezentujących 18 gatunków. Głębokie różnice wykazane pomiędzy szczepami wywołującymi gorączki powrotne a grupą odpowiedzialną za boreliozę z Lyme, spowodowała, że niektórzy badacze wprowadzają nazwę *Borreliella* dla przedstawicieli tej ostatniej grupy. Wielu badaczy jednak uważa, że przyczyni się to do zamieszania w i tak już skomplikowanej taksonomii tej grupy krętków. W związku z tym dotychczas nie przyjęto nowej nazwy i nie wyodrębniono nowego rodzaju. Ponieważ prowadzone są obecnie gorące dyskusje i spory, konieczne będzie rozstrzygnięcie tej debaty przez właściwe komitety taksonomiczne [5].

3. Objawy kliniczne

Objawy gorączek powrotnych przenoszonych przez wszy oraz przez kleszcze są bardzo podobne (Tabela II). Obserwowane różnice mogą być związane z właściwościami wywołujących je szczepów, wielkością dawki zakażającej, stanem odporności gospodarza i ogólnym stanem zdrowia chorego [3, 4, 16, 19, 28, 31].

Czas inkubacji zakażenia, zwłaszcza gorączki powrotnej przenoszonej przez wszy, jest trudny do ustalenia, ponieważ ekspozycja na wszy jest rozciągnięta w czasie jak również kontakt z kleszczem może być niezauważony. Przyjmuje się, że w przypadku gorączki przenoszonej przez kleszcze czas inkubacji choroby jest krótszy, następnie okresy wysokiej gorączki i bezgorączkowe są także krótsze w porównaniu z gorączką powrotną, przenoszoną przez wszy. Dla obu rodzajów gorączek powrotnych charakterystyczna jest nagła, wysoka gorączka, z dreszczami, silnym bólem głowy, bólami mięśni i stawów, ospałością, światłowstrętem i kaszlem. Początkowo stwierdza się podbiegnięte krwią spojówki, wybroczyny, powiększenie i tkliwość wątroby oraz śledziony. Rzadziej stwierdza się sztywność karku, szmery i rzężenie w płucach, powiększenie węzłów chłonnych i żółtaczkę. W przebiegu choroby, gorączka okresowo nasila się i towarzyszy jej przyśpieszony oddech i częstoskurcze. Częste są krwawienia (rzadko obfite) z nosa, wylewy podspojówkowe, krwioplucie, krwiomocz. Występujące zapalenie tęczówki może prowadzić do stałego upośledzenia widzenia. Mogą wystąpić objawy zapalenia płuc, oskrzeli lub zapalenie ucha środkowego. Często, pod koniec pierwszego epizodu gorączki może wystąpić na tułowiu wysypka trwająca 1 do 2 dni. Objawy neurologiczne, takie jak śpiączka, porażenie nerwów czaszkowych, porażenie połowiczne, zapalenie mózgu i ataki padaczkowe obserwowane są u około 30% chorych. Zapalenie mięśnia sercowego z arytmią, krwotok mózgowy i niewydolność wątroby są najczęstszą przyczyną zgonów.

Tabela II
Objawy kliniczne gorączek powrotnych

Objawy kliniczne	Średnia częstość objawów	
	w chorobie przenoszonej przez wszy	w chorobie przenoszonej przez kleszcze
Śmiertelność	4–40%	2–5%
Czas inkubacji	4–18 dni	4–18 dni
Czas trwania 1-szego ataku gorączki	5–6 dni	3 dni
Czas trwania okresu bezgorączkowego	9 dni	7 dni
Czas trwania nawrotów gorączki	2 dni	2–3 dni
Liczba nawrotów	1–5	0–13
Maksymalna temperatura	38,3–38,9	
Powiększenie śledziony	77%	41%
Powiększenie wątroby	66%	17%
Żółtaczka	36%	7%
Wysypka	8%	28%
Objawy ze strony układu oddechowego	34% (kaszel)	16%
Objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego	30%	9%

Pierwszy epizod gorączkowy kończy się zwykle w 3–6 dniu. Po 7–10 dniach, gorączka i inne objawy choroby powracają. Krętki pojawiają się we krwi w okresach gorączkowych, znikają wraz ze spadkiem temperatury i ponownie powracają do krwiobiegu w kolejnym epizodzie gorączkowym. Bakteriemia w przebiegu gorączki powrotnej przenoszonej przez wszy, może osiągać liczbę 100 000 krętków/mm^3 krwi. W okresie bezgorączkowym krętki obecne są w narządach wewnętrznych skąd po namnożeniu ponownie wysiewają się do krwiobiegu, jednak zmienione antygenowo, co pozwala im uniknąć neutralizacji przez swoiste przeciwciała skierowane przeciw pierwotnej wersji antygenowej krętków, odpowiedzialnej za pierwotną bakteriemię i pierwszy epizod gorączki. Nowy wzór antygenowy stymuluje produkcję nowych przeciwciał skierowanych przeciw zmienionym antygenom krętków, co umożliwia ich usunięcie z krwiobiegu. Ten cykliczny proces zmienności antygenowej i produkcji swoistych przeciwciał są odpowiedzialne za powtarzające się nawroty choroby.

Borrelia miyamotoi – krętki zaliczane do grupy wywołującej gorączki powrotne, które zostały wyizolowane z kleszczy *Ixodes persulcatus* w Japonii w latach 1990–1992, na wyspie Hokkaido przez Kenji Miyamoto. W 1995 roku, genom krętków izolowanych na Hokkaido został zbadany przez M. Fukunaga i wsp., którzy stwierdzili, że jest to nowy gatunek krętków i nazwali go *B. miyamotoi* [11]. Nazwa gatunkowa *miyamotoi* została nadana przez Masahito Fukunaga, dla uhonorowania K. Miyamoto, który pierwszy wyizolował z kleszczy te krętki [12].

B. miyamotoi izolowano z kleszczy w Azji (w Japonii i Rosji), w Ameryce Północnej (w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie) oraz w Europie (we Francji, Czechach, Norwegii, Polsce, Belgii, Wielkiej Brytanii, Danii, Estonia, Szwecji, Szwajcarii, Niemczech i na Węgrzech) [16].

W przeciwieństwie do wcześniej opisanych krętków z grupy gorączek powrotnych przenoszonych przez kleszcze, które występują raczej lokalnie, *B. miyamotoi* i wywoływane przez nie zakażenia wykrywane są na półkuli północnej, w całej strefie umiarkowanej. W związku z tym wywoływana przez nie borelioza Miyamoto (*B. miyamotoi* disease) została uznana za nowo pojawiające się zagrożenie (emerging disease) [15, 20].

Dotychczas opisano jedynie kilkadziesiąt udokumentowanych przypadków zachorowań u ludzi. Zarówno w USA jak i w Europie stwierdzono, że *B. miyamotoi* wywołuje zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu [24, 29]. Objawom towarzyszy zwykle gorączka sięgająca 40°C (u ponad 10% badanych wystąpiło od dwóch do trzech epizodów gorączki), ból głowy, zawroty głowy, znużenie, dreszcze, pocenie się, wzmożone pragnienie, bóle mięśni i stawów, mdłości, wymioty oraz zaburzenia w funkcji nerek (skąpomocz, leukocyty, erytrocyty, komórki nabłonka w moczu) [9, 25]. Przejściowo u chorych może wystąpić leukopenia i trombocytopenia oraz wzrost enzymów AST/ALT. W Polsce, w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego – Państwowym Zakładzie Higieny, materiał genetyczny krętków *B. miyamotoi* metodą PCR i sekwencjonowaniem stwierdzono dotychczas u jednego chorego (opis przypadku w druku).

4. Podsumowanie

Czynnikiem etiologicznym gorączek powrotnych są różne gatunki krętków należących do rodzaju *Borrelia*. Zaliczane są one z jednej strony do nowych bądź nawracających chorób zagrażających człowiekowi (emerging, re-emerging diseases) z drugiej strony nadal należą do chorób zaniedbywanych (neglected diseases). Przyszłe badania powinny obejmować ustalenie częstości ich występowania i rozpowszechnienia w różnych rejonach geograficznych. Opracowanie łatwej do wdrożenia diagnostyki będzie mieć kluczowe znaczenie dla dokładnego zbierania tych danych. Obecnie diagnostyka opiera się głównie na wykrywaniu DNA krętków metodami PCR lub Real time-PCR. Nie są dostępne komercyjne testy określające poziom swoistych przeciwciał. Badania kliniczne, epidemiologiczne i ekologiczne, w tym rola rezerwuaru zwierzęcego lub wektora (kleszcze i wszy), pozwolą na zidentyfikowanie możliwości zapobiegania tym zakażeniom, gdyż dotychczas nie wyprodukowano skutecznej szczepionki.

Piśmiennictwo

1. Barbour A.G.: Phylogeny of a relapsing fever *Borrelia* species transmitted by the hard tick *Ixodes scapularis*. *Infect. Genet. Evol.* **27,** 551–558 (2014)
2. Barbour A.G., Miller S.C.: Genome sequence of *Borrelia parkeri,* an agent of enzootic relapsing fever in Western North America. *Infect. Genet. Evol.* **2**, 14 (2014)
3. Castilla-Guerra L., Martin-Martin J., Colmenero-Camacho M.A.: Tick-borne relapsing fever, Southern Spain, 204–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 2217–2219 (2016)
4. Christensen A.M., Pietralczyk E., Lopez J.E., Brooks C., Schriefer M.E., Wozniak E., Stermole B.: Diagnosis and management of *Borrelia turicatae* infection in febrile soldier, Texas, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 883–884 (2017)
5. Cutler S.J., Ruzic-Sabljic E., Podkonjak A.: Emerging borreliae – expanding beyond Lyme borreliosis. *Mol. Cell. Probes.* **31**, 23–27 (2017)
6. Cutler S.J., Moss J., Fukunaga M., Wright D.J.M., Fekade D., Warrell D.: *Borrelia recurrentis* characterization and comparison with relapsing-fever, Lyme – associated, and other *Borrelia* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 958–968 (1997)
7. Elbir H., Fotso-Fotso A., Diatta G., Trape J.F., Armathau C., Renaud F., Durand P.: Ubiquitous bacteria *Borrelia crocidurae* in Western African ticks *Ornithodoros sonrai. Parasit. Vectors.* **8**, 477 (2015)

8. Evans N.J., Bown K., Timofte D., Simpson V.R., Birtles R.J.: Fatal borreliosis in bat caused by relapsing fever spirochete, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **15**,1331–1333 (2009)
9. Fiecek B., Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: *Borrelia miyamotoi* − new etiologic agent of neuroborreliosis. *Przegl. Epidemiol.* **71**, 531−538 (2017)
10. Fotso-Fotso A., Drancourt M.: Laboratory diagnosis of tick-borne African relapsing fevers: latest developments. *Front. Public. Health.* **3**, 251, (2015)
11. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D., McClelland M., Nakao M.: Genetic and philogenetic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov. isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector of Lyme disease in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 804–810 (1995)
12. Henry R.: Etymology: *Borrelia miyamotoi*. *Emerg. Infect. Dis.* **20,** 1390 (2014)
13. Johnson Jr. W.D.: *Borrelia* species (Relapsing fever) (w) Principles and Practice of Infectious Diseases, red. Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett J.E., Churchill Livingstone Inc., New York, 1995, s. 2141–2143
14. Jordan B.E., Onks K.R., Hamilton S.W., Hayslette S.E., Wright S.M.: Detection of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia lonestari* in birds in Tennessee. *J. Med. Entomol*. **46**, 131–138 (2009)
15. Koetsveld J., Draga R.O.P., Wagemakers A., Manger A., Oei A., Visser C.E., Hovius J.W.: *In vitro* susceptibility of the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* DOI:10.1128/AAC.00535-17 (2017)
16. Krause P.J., Fish D., Narasimhan S., Barbour A.G.: *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin. Microbiol. Infect*. **7**, 631–639 (2015)
17. Kumsa B., Socolovschi C., Raoult D., Parola P.: New *Borrelia* species detected in ixodid ticks in Oromia, Ethiopia. *Ticks. Tick. Borne. Dis*. **6**, 401–407 (2015)
18. Lee J.K., Smith W.C., Mcintosh C., Ferrari F.G., Moore-Henderson B., Varela-Stokes A.: Detection of a *Borrelia* species in questing Gulf Coast ticks, *Amblyomma maculatum*. *Ticks. Tick. Borne. Dis*. **5**, 449–452 (2014)
19. Leen I., Bruynseels P., Mukandi B.K., van Oort M., van den Akken M.: A 13-year old girl with pancytopenia at the presentation of a *Borrelia hispanica* infection: a case report and review of the literature. *J. Medical. Case. Reports*. **11**, 51 (2017)
20. Magnarelli L.A., Anderson J.F., Johnson R.C.: Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J. Infec. Dis.* **156**, 183–188 (1987)
21. McCoy B.N., Maiga O., Schwan T.G.: Detection of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus geigyi* from Mali. *Ticks. Tick. Borne. Dis*. **5**, 401–403 (2014)
22. McDowell J.V., Tran E., Hamilton D., Wolfgang J., Miller K., Marconi R.T.: Analysis of the ability of spirochete species associated with relapsing fever, avian borreliosis, and epizootic bovine abortion to bind factor H and cleave C3b. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3905–3910 (2003)
23. Nunes M., Parreira R., Maia C., Lopes N., Fingerle V., Vieira M.L.: Molecular identification of *Borrelia* genus in questing hard ticks from Portugal: phylogenetic characterization of two novel relapsing fever-like *Borrelia* sp. *Infect. Genet. Evol.* **40**, 266–274 (2016)
24. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Fish D., Krause P.J.: Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1816–1823 (2011)
25. Sarksyan D.S., Maleev V.V., Platonov A.E., Platonova O.V., Karan L.S.: Relapsing (recurrent) disease caused by *Borrelia miyamotoi*. *Ter. Arkh.* **87**, 18–25 (2015)
26. Schwan T., Anderson J.M., Lopez J.E., Fischer R.J., Raffel S.J., McCoy B.N., Safronetz D., Sogoba N., Maiga O., Traore S.F.: Endemic foci of the tick-borne relapsing fever spirochete *Borrelia croicidurae* in Mali, West Africa, and the potential for human infection. *Plos Negl. Trop. Dis.* **6**, 11 (2012)
27. Socolovschi C., Tahar Kernif T., Didier Raoult D., Philippe Parola P.: *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* Species in Bat Ticks, France, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 1966–1975 (2012)
28. Toledo A., Monzón J.D., Coleman J.L., Garcia-Monco J.C., Benach J.L.: Hypercholesterolemia and ApoE deficiency result in severe infection with Lyme disease and relapsing-fever *Borrelia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 5491–5496 (2015)
29. Wagemakers A., Staarink P.J., Sprong H., Hovius J.W.: *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends. Parasitol.* **31**, 260–269 (2015)
30. Wang G., Schwartz I.: Genus II. Borrelia Swellengrebel 1907, (w) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, red. Goodfellow M., Kampfer P., Chun J., De Vos P., Rainey F.A., Whitman W.B., Springer, New York, 2011, s. 484–498
31. Wilder H.K., Wozniak E., Huddleston E., Tata S.R., Fitzkee N.C., Lopez J.E.: Case report: a retrospective serological analysis indicating human exposure to tick-borne relapsing fever spirochetes in Texas. *Plos Negl. Trop. Dis.* DOI:10.137/journal.pntd.0003617 (2015)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 47–57
http://www.pm.microbiology.pl

MECHANIZMY OPORNOŚCI NA FLUOROCHINOLONY KODOWANE PLAZMIDOWO – PMQR

Katarzyna Piekarska*

Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w grudniu 2017 r.

Streszczenie: Fluorochinolony (FQ) to grupa syntetycznych chemioterapeutyków o właściwościach bakteriobójczych i szerokim spektrum aktywności, powszechnie stosowanych w terapii wielu zakażeń u ludzi i zwierząt. W ostatnich latach, wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* obserwowany jest wyraźny wzrost oporności na te związki. Miejscem docelowego działania FQ są dwa enzymy bakteryjne: gyraza (topoizomeraza II) i topoizomeraza IV, które odgrywają zasadniczą rolę podczas replikacji, transkrypcji, rekombinacji i naprawy bakteryjnego DNA. Istnieją dwie kategorie mechanizmów warunkujących oporność na FQ, tj. chromosomowe i nabyte. Mutacje w chromosomowych genach kodujących gyrazę i topoizomerazę IV są najczęstszymi mechanizmami odpowiedzialnymi za wysoki poziom oporność na FQ. Mutacje występują również w genach regulatorowych kontrolujących ekspresję natywnych pomp zlokalizowanych w błonie bakteryjnej. W ostatnich dwóch dekadach odkryto trzy mechanizmy oporności na chinolony kodowane plazmidowo (PMQR), w tym: białka Qnr, wariant acylotransferazy aminoglikozydowej – AAC (6,) – Ib-cr i pompy błonowe – QepA i OqxAB. Chociaż same mechanizmy PMQR powodują jedynie niski poziom oporności na FQ, swoją aktywnością sprzyjają skutecznej selekcji mutacji w genach gyrazy i topoizomerazy IV i nabywaniu przez szczep bakteryjny wysokiej oporności na FQ. Ponadto, mechanizmy PMQR często występują w plazmidach MDR wraz z innymi determinantami oporności (ESBL, pAmpC, KPC), co sprzyja rozpowszechnianiu fenotypu wielolekooporności. W pracy, podjęto próbę dokonania przeglądu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw oporności na fluorochinolony występującej u pałeczek *Enterobacteriaceae*.

1. Wstęp. 2. Mechanizm działania fluorochinolonów. 3. Oporność na fluorochinolony kodowana chromosomowo. 3.1. Mutacje prowadzące do zmiany aktywności enzymów docelowych. 3.2. Redukcja stężenia leku w cytoplazmie – pompy błonowe. 4. Oporność na fluorochinolony kodowana plazmidowo. 4.1. Białka Qnr. 4.2. Enzym AAC(6')-Ib-cr. 4.3. Pompy kodowane plazmidowo: QepA i OqxAB. 4.4. Wpływ PMQR na poziom oporności. 5. Podsumowanie

Plasmid-mediated quinolone resistance – PMQR

Abstract: Fluoroquinolones (FQ) are broad-spectrum antimicrobial agents widely used to treat a range of infections in clinical medicine. However, the surveillance studies demonstrate that fluoroquinolone resistance rates increased in *Enterobacteriaceae* in the past years. FQ inhibit bacterial DNA synthesis by interfering with the action of two bacterial enzymes – DNA gyrase and topoisomerase IV. There are two categories of quinolone resistance mechanisms: chromosomally encoded and acquired. Mutations in chromosomal genes encoding gyrase and topoisomerase IV are the most common mechanisms responsible for high-level fluoroquinolone resistance. Mutations can occur also in regulatory genes which control the expression of native efflux pumps located in bacterial membrane. Furthermore, three mechanisms of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) have been discovered so far, including Qnr proteins, the aminoglycoside acetylotransferase variant – AAC(6')-Ib-cr, and plasmid-mediated efflux pumps – QepA and OqxAB. Although the PMQR mechanisms alone cause only low-level resistance to fluoroquinolone, they can complement other mechanisms of chromosomal resistance and facilitate the selection of higher-level resistance. Moreover, plasmids with PMQR mechanisms often encode additional resistance traits (ESBLs, pAmpC, KPC) contributing to multidrug resistance (MDR). This review is focused on a range of molecular mechanisms which underlie quinolone resistance.

1. Introduction. 2. Mechanisms of fluoroquinolone action. 3. Chromosomally-encoded fluoroquinolone resistance. 3.1. Mutations changing the functions of target enzymes. 3.2. Reduction of drug concentration in the cytoplasm – efflux pump. 4. Plasmid-mediated quinolone resistance. 4.1. Qnr proteins. 4.2. AAC(6')-Ib-cr enzyme. 4.3. Plasmid-mediated efflux pump: QepA i OqxAB. 4.4. The impact of PMQR on fluoroquinolone susceptibility level. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Enterobacteriaceae*, oporność na fluorochinolony, PMQR
Key words: *Enterobacteriaceae*, fluoroquinolone resistance, PMQR

1. Wstęp

Na przestrzeni prawie sześciu dekad chinoliny stały się z małoistotnej klasy leków stosowanych głównie do leczenia infekcji w obrębie układu moczowego, jednymi z najczęściej przepisywanych związków przeciwbakteryjnych wykorzystywanych w leczeniu różnego rodzaju infekcji [22].

Chinoliny, jak i ich fluorowane pochodne, to grupa syntetycznych chemioterapeutyków o bakteriobójczych właściwościach i szerokim spektrum aktywności [30, 31]. Pierwszym chinolonem wprowadzonym do lecznictwa w latach 60-tych, był kwas nalidyksowy – związek stosowany wyłącznie w terapii zakażeń układu moczowego [22]. W następnych latach, modyfikowano chemicznie cząstkę chinolonów wprowadzając

* Autor korespondencyjny: Dr Katarzyna Piekarska, Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 5421263; e-mail: kpiekarska@pzh.gov.pl

różne podstawniki, skutkiem czego było zsyntetyzowanie związków o szerszym spektrum aktywności i doskonalszych parametrach farmakokinetycznych. Kluczowa modyfikacja dotyczyła m.in. wprowadzenia do cząsteczki chinolonów w pozycji 6 ich podstawowego szkieletu atomu fluoru, co doprowadziło do opracowania grupy związków, znanych dziś jako fluorochinolony (FQ) [3]. Szerokie spektrum aktywności FQ, dość dobre przenikanie do większości tkanek i osiąganie w nich wysokich stężeń terapeutycznych, relatywnie niska toksyczność oraz możliwość podania zarówno doustnie, jak i parenteralnie sprawiło, że są one powszechnie stosowane w terapii wielu zakażeń u ludzi i zwierząt. Konsekwencją powszechnego stosowania tej grupy leków jest coraz częstsze występowanie u ludzi, także poza placówkami opieki medycznej, jak i w środowisku, wielu gatunków bakterii opornych na FQ [15].

Przez lata uważano, że oporność na chinoliny związana jest z występowaniem chromosomowo kodowanych mechanizmów, głównie mutacji. Jednak, pod koniec ubiegłego wieku pojawiły się pierwsze doniesienia opisujące nowe, kodowane plazmidowo mechanizmy oporności na chinoliny tzw. PMQR (Plasmid-Mediated Quinolone Resistance) [50]. Co więcej, w ostatnich latach nastąpił wyraźny wzrost badań w zakresie występowania tych mechanizmów wśród różnych gatunków pałeczek *Enterobacteriaceae*.

Aktualnie na świecie podejmowane są działania mające na celu ograniczenie stosowania FQ zarówno w medycynie, jak i weterynarii. Należy jednak podkreślić, że w wielu krajach, wciąż brakuje nadzoru nad stopniem zużycia FQ i związków o podobnej strukturze, jak i odsetkiem szczepów opornych na tę grupę chemioterapeutyków. W Europie, tego typu informacje zbierane są przez ECDC (Europeaen Centre for Disease Prevention and Control).

W związku z obserwowaną w krajach europejskich zróżnicowaną sytuacją, na wybranych przykładach, porównano stopień konsumpcji FQ oraz odsetek szczepów opornych (Ryc. 1) [20, 21]. Jak powszechnie wiadomo, w Skandynawii (Norwegia, Szwecja) występuje dość niski wskaźnik spożycia antybiotyków, w tym FQ. Występuje tam również relatywnie niski odsetek szczepów (zarówno *Escherichia coli*, jak i *Klebsiella pneumoniae*) opornych na tę grupę leków. Zupełnie odwrotna sytuacja występuje w krajach basenu Morza Śródziemnego (Włochy, Grecja), w których zarówno spożycie FQ, jak i odsetek szczepów opornych jest wysoki. Z danych zebranych przez ECDC [20, 21] wynika, że także w Polsce, szczególnie w odniesieniu do *K. pneumoniae*, występuje wysoki odsetek szczepów opornych. Co więcej, obserwowana w naszym kraju sytuacja może być skutkiem względnie częstego stosowania FQ w praktyce klinicznej (Ryc. 1).

Dlatego też, ze względu na skalę i istotę problemu, w niniejszym opracowaniu, podjęto próbę dokonania przeglądu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw oporności na fluorochinolony występującej u pałeczek *Enterobacteriaceae*.

2. Mechanizm działania fluorochinolonów

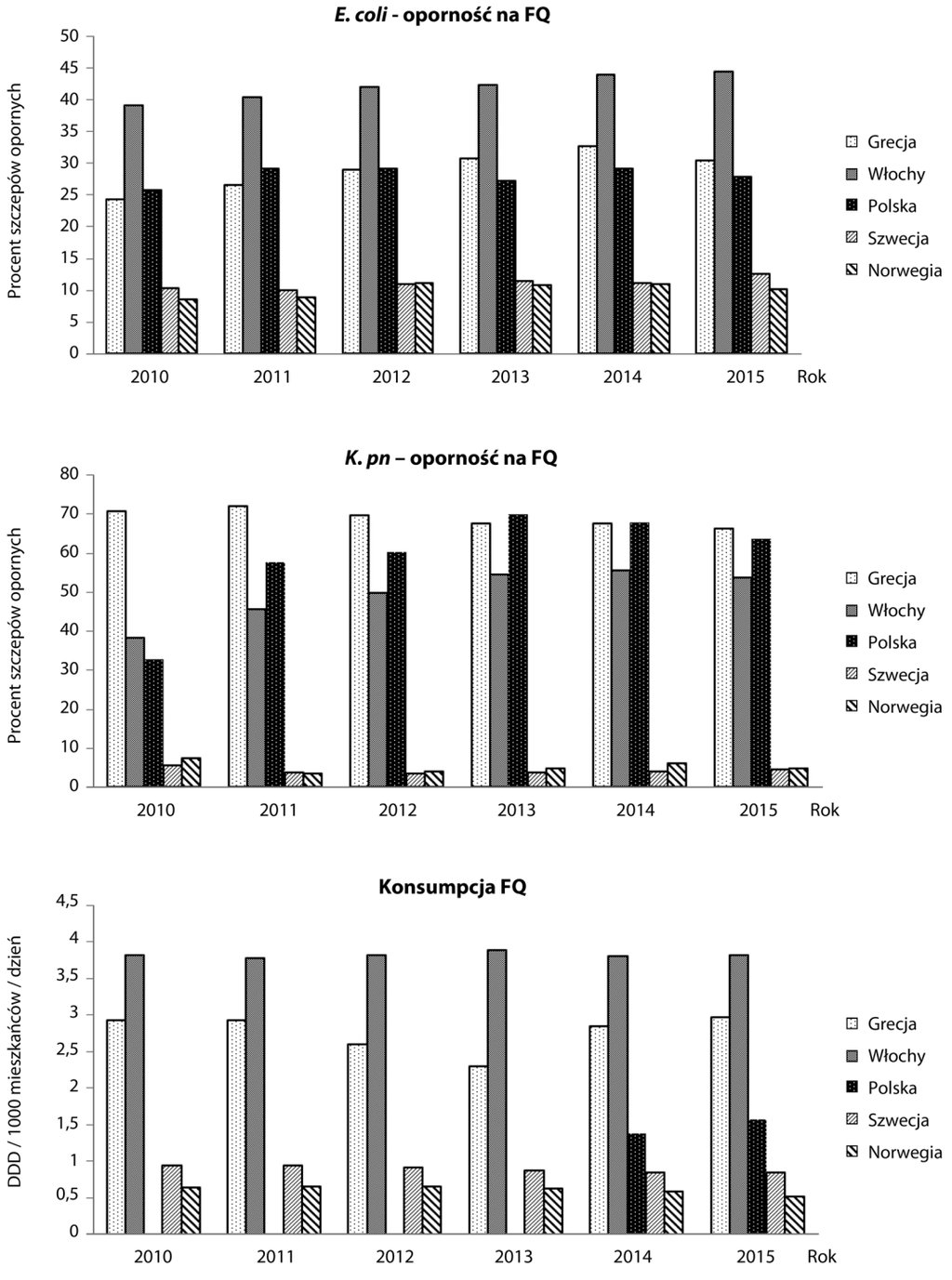
Miejscem docelowego działania fluorochinolonów są dwa enzymy bakteryjne: gyraza (topoizomeraza II) i topoizomeraza IV [30]. Gyraza jest tetramerem ($GyrA_2B_2$), składającym się z dwóch podjednostek GyrA (97 kDa) i dwóch GyrB (90 kDa), kodowanych odpowiednio przez chromosomowe geny: *gyrA* i *gyrB* [30, 35, 67]. Topizomeraza IV ($ParC_2E_2$) zaś jest analogiem gyrazy, złożonym z dwóch podjednostek ParC (75 kDa) i dwóch ParE (70 kDa), kodowanych odpowiednio przez chromosomowe geny: *parC* i *parE* [30, 35, 67]. Enzymy te odgrywają zasadniczą rolę podczas replikacji, transkrypcji, rekombinacji i naprawy bakteryjnego DNA [30, 35, 67]. Podstawową funkcją gyrazy jest wprowadzanie ujemnego superhelikalnego skrętu do nici DNA, co odgrywa istotną rolę podczas procesu replikacji i transkrypcji [4, 14]. Zablokowanie aktywności gyrazy doprowadza do nagromadzenia dodatnich skrętów i zahamowania procesu replikacji DNA. Rola topoizomerazy IV polega na umożliwieniu rozdzielenia siostrzanych nici DNA po zakończeniu procesu replikacji [4, 14, 17].

W celu zmiany stopnia superzwinięcia cząsteczki DNA, gyraza i topoizomeraza IV powodują przejściowe pęknięcie dwuniciowego DNA, w konsekwencji czego dochodzi do kowalencyjnego związania enzymu z DNA i utworzenia kompleksu enzym-DNA [18]. Oba te enzymy są hamowane przez fluorochinolony, które stabilizacją połączenie enzym-DNA (powstaje potrójny kompleks FQ-enzym-DNA). Powstały kompleks staje się nieodwracalny, czego skutkiem jest zahamowanie syntezy DNA, prowadzące do zablokowania podziału komórki i jej śmierci [17, 18]. Zarówno gyraza, jak i topoizomeraza IV modulują topologię DNA poprzez regulację stopnia skręcenia cząsteczki DNA w komórce bakteryjnej, czego efektem jest zaburzenie replikacji DNA (w obecności niskich stężeń FQ) lub śmierć komórki (w obecności wysokich stężeń FQ) [17, 19].

3. Oporność na fluorochinolony kodowana chromosomowo

3.1. Mutacje prowadzące do zmiany aktywności enzymów docelowych

W odpowiedzi na wprowadzenie do lecznictwa chinolonów wśród różnych gatunków bakterii zaczęto obserwować wzrastającą liczbę szczepów opornych na



Ryc. 1. Porównanie odsetka opornych na FQ szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae* izolowanych w Polsce w latach 2010–2015 z odsetkiem szczepów opornych izolowanych w wybranych krajach europejskich o odpowiednio niskim i wysokim zużyciu FQ wg ECDC [20, 21].

tę grupę związków. Podstawowy mechanizm warunkujący wysoki poziom oporności polega na zmianie budowy (modyfikacji sekwencji aminokwasowej) poszczególnych podjednostek gyrazy i/lub topoizomerazy IV, czego skutkiem jest zmniejszenie lub utrata powinowactwa do leku [30, 35]. Modyfikacja ta jest zwykle wynikiem spontanicznych mutacji, w jednym bądź w kilku genach chromosomowych (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), prowadzących do zmiany sekwencji kodowanych aminokwasów. Mutacje te występują najczęściej w określonych, krótkich odcinkach (rejonach) genów – nazwanych rejonami warunkującymi oporność na fluorochinolony – QRDR (Quinolone-Resistance Determinig Region). Według danych piśmiennictwa, w przypadku *E. coli*, mutacje związane ze wzrostem oporności na fluorochinolony najczęściej obserwowane

są: w GyrA pomiędzy 67 a 106 aminokwasem i/lub 63 a 102 aminokwasem w ParC. Prowadzą one najczęściej do zmiany kodowanego aminokwasu, a w konsekwencji do zmiany właściwości białka [30, 34]. Aminokwasem najczęściej ulegającym substytucji w GyrA u *E. coli* (jak również u innych gatunków) jest Ser83 i Asp87 [30, 90]. Uważa się, iż substytucje: Ser83Trp i Ser83Leu redukują zdolność wiązania norfloksacyny do kompleksu gyraza – DNA [86]. Przyjmuje się również, że substytucja seryny w pozycji 83 GyrA *E. coli* ma niewielki wpływ na katalityczne właściwości gyrazy [5]. Inaczej jest w przypadku substytucji znajdującego się w sąsiedztwie kwasu asparaginowego Asp87 (lub innych aminokwasów o charakterze kwaśnym znajdujących się w tej pozycji w przypadku innych gatunków), która obniża 5–10-krotnie katalityczne właściwości gyrazy [5, 34].

Wykazano także, że z opornością na FQ związane są mutacje występujące w podjednostce GyrB (Asp426Asn i Lys447Glu u *E. coli*) i ParE (Leu445His u *E. coli*) [8, 91]. Jednak, co istotne, są one zdecydowanie mniej rozpowszechnione w porównaniu z mutacjami spotykanymi w GyrA i ParC [30]. Zauważyć należy także, że rejon występowania mutacji (QRDR) w genie w przypadku GyrB i ParE jest bardziej odległy w porównaniu z QRDR GyrA czy ParC.

Poziom oporności drobnoustroju na działanie fluorochinolonów, zależy od właściwości chemicznych aminokwasu, który na skutek mutacji zastąpił naturalnie występujący. Niektóre mutacje mogą prowadzić do niewielkiej utraty powinowactwa enzymu do cząsteczki fluorochinolonu, a przez to do niewielkiego wzrostu wartości MIC FQ, inne zaś mogą znacznie zmniejszać to powinowactwo co pociąga za sobą znaczny wzrost wartości MIC [30, 35]. Poziom oporności może także zależeć od liczby mutacji w genach [30, 35]. Mutacje dotyczące jednego aminokwasu w podjednostce gyrazy lub topoizomerazy IV mogą skutkować umiarkowanym wzrostem MIC, zaś kolejne zmiany zachodzące w tym samym enzymie mogą powodować dalszy wzrost minimalnego stężenia hamującego [30, 34]. Oporność wysokiego rzędu jest zatem następstwem pojawienia się mutacji, doprowadzającej do zmiany struktury enzymu będącego drugorzędowym miejscem docelowego działania FQ [30, 34].

Dla wielu FQ stosowanych klinicznie, w tym ciprofloksacyny, podstawowym miejscem docelowego działania (czyli enzymem bardziej wrażliwym) w przypadku bakterii Gram-ujemnych jest gyraza, podczas gdy u bakterii Gram-dodatnich – topoizomeraza IV [18, 30, 58]. W przypadku większości FQ pojedyncze mutacje w *gyrA* powodują 8–16-krotny wzrost oporności [34, 67]. Natomiast wysoki poziom oporności (MIC ciprofloksacyny ≥ 16 mg/l) związany jest najczęściej z mutacjami w obu enzymach, tj. gyrazie i topoizomerazie IV [79]. Kumulacja mutacji znaczących tzn. dwie mutacje w *gyrA* i jedna w *parC* warunkuje 60-krotny wzrost oporności [58, 67].

3.2. Redukcja stężenia leku w cytoplazmie – pompy błonowe

Drugi mechanizm oporności na fluorochinolony, ma na celu obniżenie stężenia chemioterapeutyku w cytoplazmie i polega na czynnym usuwaniu cząsteczek FQ z komórki poprzez kompleksy białkowe tzw. pompy błonowe (efflux pump) [32, 33]. FQ, by dotrzeć do obecnych w cytoplazmie enzymów, gyrazy i topoizomerazy IV, muszą pokonać barierę złożoną ze ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej u Gram-dodatnich oraz dodatkowo zewnętrzną błonę u drobnoustrojów Gram-ujemnych. Ściana komórkowa stanowi tylko niewielką przeszkodę dla małych molekuł takich, jak chinolony, których ciężar cząsteczkowy wynosi około 300–400 Da [30, 33]. Leki te, jako związki amfoteryczne, dostają się do wnętrza komórki bakterii Gram-ujemnych na drodze pasywnej dyfuzji przez kanały porynowe (OmpF i OmpC) i mogą ulegać akumulacji [34, 35]. Mechanizm czynnego wypompowywania chemioterapeutyku z komórki bakteryjnej ma tu zasadnicze znaczenie, zaś ochronna funkcja pomp błonowych polegająca na usunięciu toksyn z wnętrza komórki, pozwala bakteriom przeżyć w niesprzyjającym środowisku nawet w obecności antybiotyków stosowanych podczas leczenia [33].

W zależności od budowy, swoistości substratowej, źródła wykorzystywanej energii i mechanizmu działania, pompy błonowe podzielić można na dwie główne grupy: tzw. transportery kasetonowe ABC wykorzystujące energię pochodzącą z ATP oraz pompy protonowe PMF (Proton Motive Force), do których zalicza się cztery rodziny, takie jak: MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance – Nodulation Division) oraz MATE (Multidrug and Toxic compound Extruction) [65, 66]. Warto dodać, że największe znaczenie w oporności na antybiotyki i najszersze spektrum substratowe odgrywają białka transportowe należące do rodziny RND, w tym najlepiej poznany i zbadany system – AcrAB-TolC występujący u *E. coli* i *Salmonella enterica* [6, 85]. AcrB jest białkiem transportowym błony wewnętrznej (funkcjonuje jako pompa), zaś jak się przypuszcza AcrA i znajdujące się w błonie zewnętrznej białko TolC – odgrywają rolę pomocniczą [85].

Aktywność pomp wiąże się z indukowanym zwiększeniem ekspresji genów kodujących białka wchodzące w skład pomp. U pałeczek *Enterobacteriaceae* geny te zlokalizowane są głównie w chromosomie bakteryjnym i obecne są u większości przedstawicieli danego gatunku. Ekspresja genów związanych z pompami

często podlega regulacji. Mutacje w genach regulatorowych przyczyniają się do nadekspresji genów kodujących białka systemu efflux, co prowadzi do ponadprzeciętnego wzrostu zdolności usuwania FQ z komórki bakteryjnej ograniczając tym samym dostęp leku do miejsca docelowego, co powoduje wzrost wartości MIC. Mutacje w genie *acrR* (represor *acrAB*) zwiększają aktywność pompy [35], a mutacje inaktywujące *marR* (represor *marA*) umożliwiają białku MarA aktywację genów *acrAB*, *tolC* i genu *ompF* odpowiedzialnego za wytwarzanie wspomnianego wyżej białka porynowego *OmpF* [1, 2, 35]. Tak więc, fenotyp niskiej oporności na FQ warunkowany jest zarówno redukcją napływu (*influx*) leku przez kanały porynowe (ograniczona przepuszczalność błony komórkowej), jak i wzrostem jego wypływu przez system efflux.

Pomimo tego, że obecność systemu efflux jako jedynego mechanizm warunkującego oporność na FQ, powoduje niewielki (4–8-krotny) wzrost wartość MIC ciprofloksacyny, uważa się, iż jest to istotny mechanizm przyczyniający się do rozwoju wysokiego poziomu oporności na tę grupę leków [67]. Warto również zauważyć, że posiadające szeroki profil substratowy pompy związane z opornością na FQ to tzw. pompy MDR (Multiple Drug Resistance), występujące często wraz z innymi mechanizmami oporności, w tym plazmidowo kodowanymi mechanizmami warunkującymi oporność na FQ [34].

4. Oporność na fluorochinolony kodowana plazmidowo

Prawie dwie dekady temu u pałeczek Gram-ujemnych, głównie u *Enterobacteriaceae*, opisano grupę genów związanych z opornością na FQ, zlokalizowanych zazwyczaj na mobilnych elementach genetycznych – plazmidach. Stąd nazwa trzeciej grupy – mechanizmy oporności na FQ kodowane plazmidowo (PMQR). Do tej grupy mechanizmów należą: białka Qnr (prowadzące do zmiany miejsca docelowego działania antybiotyku); dwufunkcyjny wariant enzymu acetylotransferazy aminoglikozydowej – AAC(6')-Ib-cr (strukturalnie modyfikujący zarówno aminoglikozydy, jak i hydrofilowe FQ) oraz białka pomp błonowych związane z aktywnym transportem – QepA i OqxAB [80]. Pod względem funkcjonalnym wymienione mechanizmy warunkują obniżoną wrażliwość na FQ (MIC > 0,25 mg/l) lecz ich fenomen polega na tym, iż swoją aktywnością sprzyjają skutecznej selekcji mutacji w QRDR genów gyrazy i topoizomerazy IV i nabywaniu przez szczep bakteryjny wysokiej oporności na FQ, oraz na tym, że mechanizmy te mogą się szybko rozprzestrzeniać na ruchomych elementach genetycznych [34, 53].

Pierwszy kodowany plazmidowo mechanizm związany z opornością na FQ został wykryty przypadkowo, w retrospektywnych badaniach plazmidu (pMG252), który uzyskano z wyizolowanego z moczu szczepu *K. pneumoniae* [50]. W plazmidzie tym znaleziono determinanty warunkujące oporność na antybiotyki β-laktamowe (aztreonam, ceftazydym, cefotaksym, cefoksytynę, cefotetan), aminoglikozydowe (kanamycynę, gentamycynę, streptomycynę, tobramycynę), chloramfenikol, trimetoprim i chlorek rtęci. Co istotne, zaobserwowano, że po przeniesieniu plazmidu do szczepu *K. pneumoniae* z ograniczoną przepuszczalnością białek błony zewnętrznej wartość MIC ciprofloksacyny wzrosła z 4 do 32 μg/ml [50]. Tak znacznego wzrostu wartości MIC nie obserwowano w przypadku przeniesienia plazmidu do wrażliwego na chinolony szczepu *E. coli* J53 i *K. pneumoniae*. Obecność plazmidu wprawdzie powodowała ponad 30-krotny wzrost wartości MIC ciprofloksacyny (z 0,008 do 0,25 μg/ml u *E. coli* i z 0,004 do 0,125 μg/ml u *K. pneumoniae*) jednak szczepy te pozostawały nadal wrażliwe na ten związek, aczkolwiek wystąpiło już zjawisko obniżenia wrażliwości na FQ [50]. Za ten specyficzny fenotyp odpowiedzialny był fragment DNA składający się z 657 pz, a białko kodowane przez gen leżący w tym obszarze nazwano Qnr (Quinolone resistance) [50]. Wkrótce opisano więcej białek Qnr, zaś wspomniane wyżej pierwsze białko tego typu określono jako QnrA1.

4.1. Białka Qnr

Podstawową rolą białek Qnr jest ochrona gyrazy przed zablokowaniem przez kompleks przeciętego DNA i chinolonu, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia wrażliwości na FQ (MIC 0,25–1,0 μg/ml) [53, 70, 80]. Szczegółowy, molekularny mechanizm działania Qnr nie został jeszcze ostatecznie doprecyzowany. Obecnie przyjmuje się, że Qnr działa konkurencyjnie do DNA obniżając ilość trwałych i letalnych kompleksów: gyraza-DNA-chinolon w komórce bakteryjnej [34]. Mechanizm ochronny działa *in vitro* najskuteczniej przy niskich (0,5 nM) stężeniach Qnr, zaś jego wysokie stężania (25–30 μM) działają hamująco na gyrazę. Przyjmuje się również, że Qnr ma zdolność destabilizowania istniejących kompleksów: gyraza-DNA-chinolon [34]. Jak już wspomniano, choć obecność białek Qnr skutkuje „jedynie" obniżoną wrażliwością, to mechanizm ten jest istotny ze względu na to, że sprzyja selekcji szczepów wykazujących wysoki poziom oporności na FQ [34, 50, 53].

Na podstawie homologii DNA, aktualnie znanych jest 6 rodzin białek Qnr: wspomniane wyżej QnrA [50], QnrS [29], QnrB [36], QnrC [83], QnrD [11] i QnrVC [25, 64]. Poszczególne rodziny między sobą charakteryzują się zróżnicowaniem sekwencji

nukleotydowych przekraczającym 35%, co w efekcie przekłada się na znaczące zmiany aminokwasów. Co więcej, w obrębie każdej rodziny występuje duży polimorfizm genetyczny, co umożliwia identyfikację stale wzrastającej liczby alleli poszczególnych genów. Jak dotąd, według ogólnodostępnej bazy danych zamieszczonej na stronie Lahey Clinic (http://www.lahey.org/qnrstudies) opisano: 7 alleli genu *qnrA* (QnrA1--QnrA7), 9 – *qnrS* (QnrS1-QnrS 9), 82 – *qnrB* (QnrB1--QnrB82), 7 – *qnrVC* (QnrVC1-QnrVC7), 2 – *qnrD* (QnrD1-QnrD2) i 1 allel genu *qnrC* (QnrC) [37].

Geny Qnr obecne są w plazmidach o różnej wielkości i grupie niezgodności Inc (Incompatibility) [34, 40, 80], co sprzyja rozpowszechnieniu oporności na FQ w różnych gatunkach *Enterobacteriaceae*. Ponadto, ta różnorodność plazmidów wskazuje również na to, że ich nabywanie następowało w sposób niezależny, wielokrotnie [34]. Geny *qnr* najczęściej występują na transpozycyjnym elemencie, głównie IS*CR1* i IS*26* [34, 40, 80]. Zazwyczaj geny *qnr* występują w plazmidach MDR wraz z innymi determinantami oporności, w tym genami kodującymi β-laktamazy: ESBL, AmpC czy karbapenemazy [40, 80].

Qnr występują powszechnie na całym świecie wśród różnych gatunków *Enterobacteriaceae*, najczęściej *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *E. coli* i *S. enterica* izolowanych zarówno od pacjentów szpitalnych, jak i ambulatoryjnych [16, 23, 24, 41, 42, 44, 45, 51, 55, 59, 60, 72, 76]. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa dostępnego w przeglądarce PubMed, najczęściej występującą determinantą wśród szczepów *Enterobacteriaceae* izolowanych od ludzi jest gen *qnrB*. Potwierdziły to również nieliczne badania przeprowadzone w Polsce, w których gen *qnrB* stwierdzono, odpowiednio, w przypadku 26,5% pałeczek *Enterobacteriaceae* opornych na ciprofloksacynę i 8,8% *E. coli* izolowanych od noworodków przebywających na intensywnej terapii [13, 59]. Inna determinanta Qnr, gen *qnrS* (zwłaszcza *qnrS1*) był często wykrywany u kilku gatunków pałeczek jelitowych, w tym często u *Salmonella* sp. Wieloośrodkowe badania wykazały, że powyżej 10% pałeczek *Salmonella* pochodzących od zwierząt i ludzi, oraz z próbek żywności i środowiska posiadało gen *qnrS1* [82]. Obecność tego genu stwierdzono także wśród szczepów *E. coli* izolowanych od: świń na Węgrzech [81], koni w Czechach [16], a także od ubitego bydła i drobiu w Polsce [84]. Sugerować to może, że ludzie mogą nabywać ten mechanizm oporności pośrednio – drogą łańcucha pokarmowego (potencjalna możliwość transmisji od zwierząt do człowieka). Natomiast częstość występowania markerów *qnrC* i *qnrD* wydaje się być niska. Badania Mazzariol i wsp. [52] wykazały, że wśród 756 *Enterobacteriaceae* tylko cztery izolaty *Proteus mirabilis* i jeden *Morganella morganii* (w sumie 0,66%) posiadało gen *qnrD.* W innych badaniach [82] obecność genu *qnrD* stwierdzono w przypadku 22/1215 (1,8%) izolatów *Salmonella*. Natomiast w przytoczonych wyżej badaniach [52, 82] w żadnym izolacie nie stwierdzono występowania determinanty *qnrC*. Podsumowując, spośród wszystkich determinant Qnr, gen *qnrB* jest spotykany częściej niż *qnrA* czy *qnrS*, które zaś są bardziej rozpowszechnione niż *qnrD* [42, 59, 76].

Należy zauważyć, że homologiczne sekwencje do białek Qnr znajdowane są również w chromosomie wielu Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii izolowanych zarówno z próbek środowiskowych, jak i próbek materiału klinicznego [7, 39, 74]. Uważa się, że bytujące w środowisku wodnym bakterie należące do rodzaju *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Shewanella* i *Vibrio* stanowią zasadniczy rezerwuar genów q*nr* [61, 62, 63,]. I tak dla przykładu, białko QnrA1 jest w 98% homologiczne z chromosomowo determinowanym białkiem Qnr *Shewanella algae* [62], QnrS1 jest w 83% identyczne z Qnr *Vibrio splendidus* [9], zaś QnrC jest w 72% homologiczne do chromosomowo kodowanego białka Qnr *Vibrio orientalia* czy *Vibrio cholerae* [83]. Homologiczne sekwencje do QnrB są kodowane w chromosomie przedstawicieli kompleksu *Citrobacter freundii*, w tym *Citrobacter braakii*, *Citrobacter werkmanii* i *Citrobacter youngae* izolowanych zarówno z próbek klinicznych, jak i środowiskowych [38, 93]. Natomiast mały, niekoniugacyjny plazmid, w którym przenoszony jest gen *qnrD* może być obecny w różnych gatunkach *Enterobacteriaceae,* przy czym najczęściej występuje u przedstawicieli *Proteeae*, tj. *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* czy *Providencia rettgeri* [94], co też może tłumaczyć jego pochodzenie [26].

Jak się zatem wydaje, szerokie rozpowszechnienie genów *qnr* sugeruje, że występowały one w przyrodzie długo przed odkryciem chinolonów. Potwierdza to fakt wykrycia wariantów genu *qnrB* i „pseudogenów" *qnrB*--like w chromosomie szczepów *Citrobacter*, wyizolowanych jeszcze przed wprowadzeniem do użytku antybiotyków, tj. w latach 30. XX wieku [73]. Generalnie, uważa się, że częstość występowania genów *qnr* wśród szczepów klinicznych sukcesywnie wzrasta, jednak nie przekracza 10%. Dotyczy to zwłaszcza sytuacji, gdy dobór materiału do badań nie podlegał żadnemu czynnikowi selekcyjnemu [34, 45, 78]. Natomiast, zdecydowanie wyższe odsetki częstości występowania genów *qnr* obserwowano w przypadku, gdy czynnikiem selekcyjnym był fenotyp oporności np. oporność na cefalosporyny czy fluorochinolony [23, 42, 59, 76, 95].

4.2. Enzym AAC(6')-Ib-cr

AAC(6')-Ib-cr, to dwufunkcyjny wariant powszechnie występującego u pałeczek *Enterobacteriaceae* enzymu – acetylotransferazy aminoglikozydowej (AAC). Jego pierwotne działanie polega na modyfikacji czą-

steczki aminoglikozydu prowadzącej do utraty powinowactwa do podjednostki 16S rRNA, co stanowi przyczynę oporności na najczęściej stosowane w lecznictwie antybiotyki z tej grupy tj. amikacynę, tobramycynę i kanamycynę. Ponadto, AAC(6')-Ib-cr posiada zdolność do strukturalnej modyfikacji hydrofilowych fluorochinolonów tj. ciprofloksacyny i norfloksacyny [68], co obniża ich aktywność przeciwbakteryjną. Zdolność ta jest wynikiem dwóch mutacji znaczących, (Trp102Arg i Asp179Tyr), nadających temu dwufunkcyjnemu enzymowi zdolność N-acetylacji grupy aminowej znajdującej się w pierścieniu piperazynowego podstawnika hydrofilowych FQ [68, 80]. Odpowiedzialny za wytwarzanie AAC(6')-Ib-cr gen *aac(6')-Ib-cr* obecny jest w kasecie genowej jako część integronu zwykle w plazmidowym DNA, w którym przenoszone mogą być także i inne geny oporności, w tym PMQR (*qnrA1* [41], *qnrB4* [41, 48], *qnrB6* [41], *qnrB8* [41], *qnrS1* [41, 48], *qepA* [48]). Spośród determinant warunkujących inne mechanizmy oporności wraz z genem *aac(6')-Ib-cr* szczególnie często występuje gen kodujący β-laktamazę CTX-M-15 [43, 49, 72], jak również CTX-M-1 [77], CTX-M-2 [24], CTX-M-14 [41], CTX-M-24 [41], DHA-1 [48], SHV-12 [24, 48] czy karbapenemazę KPC-2 [12].

Jak wskazują dane piśmiennictwa, gen *aac(6')-Ib-cr* występuje powszechnie wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* [44, 54, 59, 60], i jak wskazują niektóre wyniki badań jest bardziej rozpowszechniony niż geny *qnrB* [54, 59, 60, 71, 89]. W zależności od źródła szczepów klinicznych i kryteriów selekcji, częstość występowania *aac(6')-Ib-cr* kształtuje się w zakresie od 0,4 do 85% [59, 68].

Warto podkreślić również, że u pałeczek *Enterobacteriaceae* obecność genu *aac(6')-Ib-cr* poza plazmidowym DNA stwierdzono także w ich chromosomie [71]. Nabycie tego genu powoduje 4-krotny wzrost wartości MIC ciprofloksacyny [68]. Co więcej, choć jego obecność skutkuje niskim poziomem oporności na niektóre FQ, to może ułatwiać przetrwanie mutantów w stężeniu przekraczającym 10-krotnie ich MPC (Mutant Prevention Concentration) [10], czego konsekwencją będzie nabycie wysokiego poziomu oporności.

4.3. Pompy kodowane plazmidowo: QepA i OqxAB

Białko QepA (aktualnie znanych jest przynajmniej trzy warianty) jest plazmidowo-kodowaną pompą błonową należącą do rodziny MFS (Major Facilitator Superfamily). Pompa ta poprzez mechanizm aktywnego usuwania z komórki hydrofilowych fluorochinolonów przyczynia się do obniżenia wrażliwości na ciprofloksacynę i norfloksacynę powodując zwiększenie MIC w zakresie od 2 do nawet 64-razy [87, 88]. Mechanizm ten, po raz pierwszy został wykryty w plazmidzie pHPA obecnym w wyizolowanym z moczu szczepie *E. coli* [87]. Wraz z genem *qepA* w plazmidzie (zwykle MDR) przenoszone są także i inne determinanty oporności, włączając w to β-laktamazy o szerokim spektrum substratowym czy aminoglikozydy. Gen *qepA* często współwystępuje wraz z genem kodującym 16S rRNA metylazę – *rmtB* [57, 88]. Jednak częstość występowania genu *qepA* wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* ogółem jest niska. Badania przeprowadzone przez Yamane i wsp. [88] wskazują, że tylko 2 (0,3%) spośród 751 przebadanych klinicznych szczepów *E. coli* posiadały tę determinantę.

OqxAB jest pompą efflux typu MDR należącą do rodziny RND białek transportowych powszechnie występującą u *K. pneumoniae*. Gen kodujący tę pompę po raz pierwszy został zidentyfikowany w plazmidzie (pOLA52), jako determinanta odpowiedzialna za oporność na używany wśród trzody chlewnej stymulator wzrostu – olaquindox [27]. Obecność genu *oqxAB* przyczynia się do oporności na m.in. chloramfenikol, trimetoprim i chinoliny, w tym kwas nalidyksowy, norfloksacynę oraz ciprofloksacynę (powoduje 16-krotny wzrost wartości MIC ciprofloksacyny) [28]. Występowanie *oqxAB* opisano wśród klinicznych izolatów zarówno w plazmidzie u *E. coli,* jak i w chromosomie, a także w plazmidzie u *K. pneumoniae* i *Salmonella* Enteritidis [46, 47, 69]. W obu sytuacjach gen flankowany był przez element transpozycyjny IS*26*. Wysoka częstość występowania pompy OqxAB (kodowanej zarówno plazmidowo, jak i chromosomowo) obserwowana jest wśród powyżej 70% szczepów *K. pneumoniae* wytwarzających β-laktamazy [56]. Przypuszcza się nawet, że drobnoustrój ten może stanowić potencjalny rezerwuar genu *oqxAB*. Jak dotąd, występowanie pompy OqxAB opisano wśród klinicznych izolatów *K. pneumoniae* wyosobnionych w Chinach, Korei Płd., Hiszpanii i USA [55, 56, 69, 92].

4.4. Wpływ PMQR na poziom oporności

Nabycie mechanizmów oporności na FQ kodowanych plazmidowo, w przypadku nieobecności mechanizmów kodowanych chromosomowo (mutacji), skutkuje wzrostem wartości MIC (< 1 mg/l) ale wartość ta pozostaje nadal w kategorii wrażliwości, zgodnie z kryteriami przyjętymi przez EUCAST [www.eucast.org/clinical breakpoints/].

Ogólnie, przyjmuje się, że obecność genów *qnr* (zwłaszcza *qnrA*, *qnrB* i *qnrS*) prowadzi do > 30-krotnej zmiany wartości MIC ciprofloksacyny i levofloksacyny, porównywalnej do zmiany wywołanej pojedynczą mutacją w podjednostce GyrA [50]. Natomiast wpływ QnrC i QnrD, na poziom oporności jest mniej zauważalny [70].

Warto zauważyć, że oddziaływanie AAC(6')-Ib-cr na wzrost wartości MIC fluorochinolonów jest

zdecydowanie niższe niż obserwowany w przypadku białek Qnr [67, 68]. Ponadto, ekspresja pompy OqxAB kodowanej plazmidowo u *E. coli* może zwiększać wartość MIC fluorochinolonów od 16- do 128-krotnie zaś MIC kwasu nalidyksowego 8-krotnie [70]. Ekspresja genu kodującego białko transportowe QepA powoduje wzrost wartości MIC kwasu nalidyksowego i ciprofloksacyny, odpowiednio 2- i 32-krotnie [70].

Pomimo tego, że wszystkie determinanty PMQR przyczyniają się, jak wspomniano, tylko do redukcji wrażliwości na fluorochinolony to w przypadku współwystępowania dwóch lub więcej mechanizmów oporności na FQ kodowanych plazmidowo obserwuje się wyższy poziom oporności [70]. I tak, w przypadku klinicznych izolatów *E. coli*, u których MIC ciprofloksacyny wynosił 4 mg/ml, nie posiadających mutacji w QRDR genów gyrazy i topoizomerazy IV stwierdzono obecność genów PMQR, tj. *qnrS1* i *oqxAB* oraz nadekspresję chromosomowo kodowanej pompy AcrAB-TolC [75].

Należy zauważyć, że wyizolowane z materiału klinicznego pałeczki *Enterobacteriaceae* zawierające mechanizmy PMQR zazwyczaj wykazują wysoki poziom oporności na fluorochinolony, co jest wynikiem współwystępowania tych determinant wraz z chromosomowo kodowanymi mechanizmami oporności, głównie mutacjami [59, 75]. Z tego względu, jak również z uwagi na to, że obecność PMQR przyczynia się do umiarkowanego wzrostu wartości MIC fluorochinolonów oraz braku specyficznych fenotypowych markerów wskazujących na obecność PMQR, w badaniach przesiewowych utrudnione jest wykrycie izolatów posiadających te mechanizmy i ich scharakteryzowanie bez zastosowania metod molekularnych.

5. Podsumowanie

Oporność na fluorochinolony jest zjawiskiem złożonym, będącym często wypadkową współwystępowania kilku mechanizmów. Wprawdzie nabycie mechanizmów oporności na FQ kodowanych plazmidowo przyczynia się zazwyczaj jedynie do obniżenia wrażliwości na tę grupę leków, ale ich obecność sprzyja selekcji mutantów o wysokim poziomie oporności, związanych z nabyciem mutacji w QRDR w trakcie terapii FQ. Ponadto, obecność mechanizmów PMQR jest dość istotna, gdyż kodujące je geny znajdują się na ruchomych elementach genetycznych dzięki czemu łatwo mogą być przekazywane horyzontalnie pomiędzy różnymi gatunkami pałeczek *Enterobacteriaceae.* Co więcej, występowanie PMQR często związane jest z opornością na inne grupy antybiotyków. Geny PMQR można znaleźć w transpozonach i/lub integronach znajdujących się w plazmidach MDR, co sprzyja rozpowszechnianiu fenotypu wielolekooporności. Niestety, do dziś nie jest znana rzeczywista częstość występowania mechanizmów PMQR wśród *Enterobacteriaceae*. Związane jest to z faktem, że jak dotąd brak jest odpowiednich testów fenotypowych zaś wiarygodne wykrywanie tych mechanizmów oparte jest o kosztowne techniki biologii molekularnej.

Podziękowania

Publikacja sfinansowana z działalności statutowej NIZP-PZH, zadanie nr 4/EM/2017.

Piśmiennictwo

1. Alekshun M.N., Levy S.B.: Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2067–2075 (1997)
2. Alekshun M.N., Levy S.B.: The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.* **7**, 410–413 (1999)
3. Ball P.: Quinolone generations: natural history or natural selection? *J. Antimicrob. Chemother*. **46** Suppl T1, 17–24 (2000)
4. Baranello L., Levens D., Gupta A., Kouzine F.: The importance of being supercoiled: how DNA mechanics regulate dynamic processes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 632–638 (2012)
5. Barnard F.M., Maxwell A.: Interaction between DNA gyrase and quinolones: effect of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser (83) and Asp(87). *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1994–2000 (2001)
6. Baucheron S., Imberechts H., Chaslus-Dancla E., Clockaert A.: The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT204. *Microb. Drug Resist.* **8**, 281–289 (2002)
7. Boulund F., Johnning A., Pereira M.B., Larsson D.G., Kristiansson E.: A novel method to discover fluoroquinolone antibiotic resistance (*qnr*) genes in fragmented nucleotide sequences. *BMC Genomics*, **13**, 695 (2012)
8. Breines, D.M., Ouabdesselam S., Ng E.Y., Tankovic J., Shah S., Soussy C.J., Hooper D.C.: Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41,** 175–179 (1997)
9. Cattoir V., Poirel L., Mazel D., Soussy C.J., Nordmann P.: *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 2650–2651 (2007)
10. Cattoir V., Nordmann P.: Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr. Med. Chem.* **16**, 1028–1046 (2009)
11. Cavaco L.M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F.M.: *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 603–608 (2009)
12. Chmelnitsky I., Hermesh O., Navon-Venezia S., Strahilevitz J., Carmeli Y.: First detection of *aac(6')-Ib-cr* in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Izrael. *J. Antimicrob Chemother*. **64**, 718–722 (2009)
13. Chmielarczyk A., Pobiega M., de Champs C., Wojkowska-Mach J., Rozanska A., Heczko P.B., Guillard T., Bulanda M.: The high

prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance among very low birth-weight infants in Poland. *Microb. Drug Resist.* **21**, 391–397 (2015)
14. Corbett K.D., Schoeffler A.J., Thomsen N.D., Berger J.M.: The structural basic for substrate specifity in DNA topoisomerase IV. *J. Mo.l Biol.* **351**, 545–561 (2005)
15. Dalhoff A.: Resistance surveillance studies: A multifaceted problem – the fluoroquinolone example. *Infection*, **40**, 239–262 (2012)
16. Dolejska M., Cizek A. i wsp.: Plasmids carrying $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J. Antimicrob. Chemother*. **66**, 757–764 (2011)
17. Drlica K.: Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr. Opin. Microbiol*. **2**, 504–508 (1999)
18. Drlica K., Malik M., Kerns R.J., Zhao X.: Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob. Agents Chemother*. **52**, 385–392 (2008)
19. Drlica K., Hiasa H., Kerns R., Malik M., Mustaev A., Zhao X.: Quinolones: action and resistance updated. *Curr. Top. Med. Chem*. **9**, 981–998 (2009)
20. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database (22.05.2017)
21. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases, http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption/Pages/antimicrobial-resistance-and-anitmicrobial-consumption.asp (22.05.2017)
22. Emmerson A.M., Jones A.M.: The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother*. **51**, 13–20 (2003)
23. Ferjani S., Saidani M., Amine F.S., Boutiba-Ben Boubaker I.: Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Tunisian hospital. *Mikrob. Drug Resist*. **21**, 158–166 (2015)
24. Fihman V., Lartigue M.F., Jacquier H., Meunier F., Schnepf N., Raskine L., Riahi J., Sanson-le Pors M.J., Berçot B.: Appearance of *aac(6')-Ib-cr* gene among extender-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a French hospital. *J. Infect.* **56**, 454–459 (2008)
25. Fonseca E.L., Vincente A.C.: Epidemiology of *qnrVC* allels and emergence out of the *Vibrionaceae* family. *J. Med. Microbiol.* **62**, 1628–1630 (2013)
26. Guillard T., Grillon A., de Champs C., Cartier C., Madoux J., Lozniewski A., Berçot B., Riahi J., Vernet-Garnier V., Cambau E.: Mobile insertion cassets as a source of *qnrD* mobilization onto small non-transmissible plasmids in *Proteeae. Plos One*, **9**, e87801 (2014)
27. Hansen L.H., Johannesen E., Burmølle M., Sørensen A.H., Sørensen S.J.: Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**, 3332–3337 (2004)
28. Hansen L.H., Jensen L.B., Sørensen H.I., Sørensen S.J.: Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J. Antimicrob. Chemother*. **60**, 145–147 (2007)
29. Hata M., Suzuki M., Matsumoto M., Takahashi M., Sato K., Ibe S., Sakae K.: Cloning of novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 801–803 (2005)
30. Hooper D.C.: Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*, **2**, 38–55 (1999)
31. Hooper D.C.: New uses for new and old quinolones and challenge of resistance. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 234–254 (2000)
32. Hooper D.C.: Emerging mechanisms of fluoroquinolones resistance. *Emerging Infect. Dis.* **7**, 337–341 (2001)
33. Hooper D.C.: Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologists. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1811–1817 (2005)
34. Hooper D.C., Jakoby G.A.: Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1354**, 12–31 (2015)
35. Jakoby GA.: Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis*. **41**, 120-126 (2005)
36. Jacoby G.A., Walsh K.E., Mills D.M., Walker V.J., Oh H., Robicsek A., Hooper D.C.: *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1178–1182 (2006)
37. Jacoby G., Cattoir V., Hooper D., Martínez-Martínez L., Nordmann P., Pascual A., Poirel L., Wang M.: *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2297–2299 (2008)
38. Jacoby G.A., Griffin C.M., Hooper D.C.: *Citrobacter* spp. As a source of *qnrB* alleles. *Antimicrob. Agents Chemother*. **55**, 4979–4984 (2011)
39. Jacoby G.A., Hooper D.C.: Phylogenetic analysis of chromosomally determined Qnr and related proteins. *Antimicrob. Agents Chemother*. **57**, 1930–1934 (2013)
40. Jacoby G.A., Strahilevitz J., Hooper D.C.: Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol. Spectr.* **2**, PLAS-0006-2013 (2014)
41. Jiang Y., Zhou Z., Qian Y., Wei Z., Yu Y., Hu S., Li L.: Plasmid--mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')--Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J. Antimicrob. Chemother*. **61**, 1003–1006 (2008)
42. Jlili Nel-H., Réjiba S., Smaoui H., Guillard T., Chau F., Kechrid A., Cambau E.: Trend of plazmid-mediated quinolone resistance genes at the Children's Hospital in Tunisia. *J. Med. Microbiol.* **63**, 195–202 (2014)
43. Karisik E., Ellington M.J., Pike R., Warren R.E., Livermore D.M., Woodford N.: Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 β-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 665–668 (2006)
44. Kim E.S., Jeong J.Y., Jun J.B., Choi S.H., Lee S.O., Kim M.N., Woo J.H., Kim Y.S.: Prevalence of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme among *Enterobacteriaceae* blood isolates in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 2643–2645 (2009)
45. Kim H.B., Park C.H., Kim C.J., Kim E.C., Jacoby G.A., Hooper D.C.: Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 639–645 (2009)
46. Kim H.B., Wang M., Park C.H., Kim E.C., Jacoby G.A., Hooper D.C.: *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 3582–3584 (2009)
47. Li L., Liu Y. i wsp.: Spread of *oqxAB* in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium predominantly by IncHI2 plasmids. *J. Antimicrob. Chemother*. **68**, 2263–2268 (2013)
48. Ma J., Wang M. i wsp.: High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 519–524 (2009)
49. Machado E., Coque T.M., Cantón R., Baquero F., Sousa J.C., Peixe L.: Dissemination in Portugal of CTX-M-15, OXA-1, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and

fluroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother*. **50**, 3220–3221 (2006)
50. Martínez-Martínez L., Pascual A., Jacoby G.A.: Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet,* **351**, 797–799 (1998)
51. Martínez-Martínez L., Pascual A., Garcia I., Tran J., Jacoby G.A.: Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother*. **51**, 1037–1039 (2003)
52. Mazzariol A., Kocsis B., Koncan R., Kocsis E., Lanzafame P., Cornaglia G.: Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, E46–48 (2012)
53. Nordmann P., Poirel L.: Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother*. **56**, 463–469 (2005)
54. Park C.H., Robicsek A., Jacoby G.A., Sahm D., Hooper D.C.: Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother*. **50**, 3953–3955 (2006)
55. Park K.S., Kim M.H., Park T.S., Nam Y.S., Lee H.J., Suh J.T.: Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance genes, aac(6')-Ib-cr, qepA, and oqxAB in clinical isolates of extended--spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Ann. Clin. Lab. Sci*. **42**, 191–197 (2012)
56. Perez F., Bonomo R.A.: OqxAB, a quinolone and olaquindox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4602–4603 (2013)
57. Périchon B., Courvalin P., Galimand M.: Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 2464–2469 (2007)
58. Piddock L. J.: Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update1994–1998. *Drugs*, **58**, 11–18 (1999)
59. Piekarska K., Wołkowicz T., Zacharczuk K., Rzeczkowska M., Chróst A., Bareja E., Olak M., Gierczyński R.: Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in tertiary hospital in Warsaw, Poland. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **45**, 238–243 (2015)
60. Pitout J.D., Wei Y., Church D.L., Gregson D.B.: Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')-Ib-cr*. *J. Antimicrob. Chemother*. **61**, 999–1002 (2008)
61. Poirel L., Liard A., Rodriguez-Martinez J.M., Nordmann P.: *Vibronaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Agents.* **56**, 1118–1121 (2005)
62. Poirel L., Rodriguez-Martinez J.M., Mammeri H., Liard A., Nordmann P.: Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother*. **49**, 3523–3525 (2005)
63. Poirel L., Cattoir V., Nordmann P.: Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between humans, animal, and environmental ecologies. *Front. Microbiol.* **3**, 24 (2012)
64. Pons M.J., Gomes C., Ruiz J.: *qnrVC*, a new transferable Qnr-like family. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* **31**, 191–192 (2013)
65. Poole K.: Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother*. **56**, 20–51 (2005)
66. Putman M., van Veen H.W., Konings W.N.: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 672–693 (2000)
67. Redgarve L.S., Sutton S.B., Webber M.A., Piddock L.J.V.: Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiol.* **22**, 438–445 (2014)
68. Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Park Ch.H., Bush K., Hooper D.C.: Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of common aminoglicoside acetylotransferase. *Nat. Med*. **12**, 83–88 (2006)
69. Rodríguez-Martínez J.M., Díaz de Alba P., Briales A., Machuca J., Lossa M.,Fernández-Cuenca F., Rodríguez Baño J., Martínez--Martínez L., Pascual Á.: Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother*. **68**, 68–73 (2013)
71. Rodríguez-Martínez J.M., Machuca J., Cano M.E., Calvo J., Martínez-Martínez L., Pascual A.: Plasmid-mediated quinolone resistance: two decades on. *Drug Resist. Updat*. **29**, 13–29 (2016)
72. Ruiz E., Saenz Y., Zarazaga M., Rocha-Gracia R., Martinez-Martinez L., Arlet G., Torres C.: *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichi coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J. Antimicrob. Chemother*. **67**, 886–897 (2012)
73. Sabtcheva S., Kaku M., Saga t., Ishii Y., Kantardjiev T.: High prevalence of the *aac(6')-Ib-cr* gene and its dissemination among *Enterobacteriaceae* isolates by CTX-M-15 plasmid in Bulgaria. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 335–336 (2009)
74. Saga T., Sabtcheva S., Mitsutake K., Ishii Y., Tateda K., Yamaguchi K., Kaku M.: Characterization of *qnrB*-like genes in *Citrobacter* species of the American Type Culture Collection. *Antimicrob. Agents Chemother*. **57**, 2863–2866 (2013)
75. Sánchez M.B., Rodríguez- Martínez J.M., Martínez-Martínez L., Martínez J. L.: Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol*. **8**, 148–161 (2008)
76. Sato T., Yokota S.-I., Uchida I., Okubo T., Usui M., Kusumoto M., Akiba M., Fujii N., Tamura Y.: Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichi coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance – determining region mutations. *Front. Microbiol*. **4**, 125 (2013)
77. Silva-Sánchez J., Cruz-Trujillo E., Barrios H., Reyna-Flores F., Sánchez-Pérez A., Bacterial Resistance Consortium, Garza--Ramos U.: Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One*, **17**, 8:e77968 (2013)
78. Soge O.O., Adeniyi B.A., Roberts M.C.: New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother*. **58**, 1048–1053 (2006)
79. Strahilevitz J., Engelstein D., Adler A., Temper V., Moses A.E., Block C., Robicsek A.: Changes in *qnr* prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 3001–3003 (2007)
80. Strahilevitz J., Hooper D.C.: Dual targeting of topoisomerase IV and gyrase to reduce mutant selection: direct testing of the paradigm by using WCK-1734, a New fluoroquinolone, and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49,** 1949–1956 (2005)
81. Strahilevitz J., Jacoby G.A., Hooper D.C., Robicsek A.: Plasmid--mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev*. **22**, 664–689 (2009)
82. Szmolka A., Fortini D., Villa L., Carattoli A., Anjum M.F., Nagy B.: First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe. *Mikrob. Drug Resist*. **17**, 567–573 (2011)

83. Veldman K., Aarestrup F.M., i wsp.: International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J. Antimicrob. Chemother*. **66**, 1278–1286 (2011)
84. Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., Hooper D.C., Wang M.: New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1892–1897 (2009)
85. Wasyl D.: Prevalence and characterization of quinolone resistance mechanisms in commensal *Escherichia coli* isolated from slaughter animals in Poland, 2009–2012. *Mikrob. Drug Resist.* **20**: 544–549 (2014)
86. Webber M.A., Piddock L.J.: Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1550–1552 (2001)
87. Willmott C.J., Maxwell A.: A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother*. **37,** 126–127 (1993)
88. Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T., Arakawa Y.: New plasmid--mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichi coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 3354–3360 (2007)
89. Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Arakawa Y.: Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother*. **52**, 1564–1566 (2008)
90. Yang J., Lu Y., Li J., Ma Y., Hu C., Jin S., Ye L., Cui S.: Characterization of clinical *Escherichia coli* isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother*. **65**, 453–459 (2010)
91. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., Nakamura S.: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1271–1272 (1990)
92. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., Yamanaka L.M., Nakamura S.: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35,** 1647–1650 (1991)
93. Yuan J., Xu X., Guo Q., Zhao X., Ye X., Guo Y., Wang M.: Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1655–1659 (2012)
94. Zhang R., Ichijo T., Huang Y.L., Cai J.C., Zhou H.W., Yamaguchi N., Nasu M., Chen G.X.: High prevalence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citobacter freundii* in China. *Microbes Environ*. **27**, 158–163 (2011)
95. Zhang S., Liu Y.H. i wsp.: Prevalence and plasmid characterization of the *qnrD* determinant in *Enterobacteriaceae* isolated from animal, retail meat products, and humans. *Microb. Drug Resist*. **19**, 331–335 (2013)
96. Zhao X., Xu X., Zhu D., Ye X., Wang M.: Decreased quinolone susceptibility in high percentage of *Enterobacter cloaceae* clinical isolates caused only by Qnr determinants. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **67**, 110–113 (2010)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 58–67
http://www.pm.microbiology.pl

FRANCISELLA TULARENSIS – REVIEW

Piotr Cieślik[1], Józef Knap[2], Agata Bielawska-Drózd[1]*

[1] Biological Threats Identification and Countermeasure Centre of the General Karol Kaczkowski Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Puławy, Poland
[2] Department of Epidemiology, Warsaw Medical University, Second Faculty of Medicine Warsaw, Poland

Submitted in October, accepted in December 2017

Abstract: In the early twentieth century, *Francisella tularensis* was identified as a pathogenic agent of tularaemia, one of the most dangerous zoonoses. Based on its biochemical properties, infective dose and geographical location, four subspecies have been distinguished within the species *F. tularensis*: the highly infectious *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) occurring mainly in the United States of America, *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) mainly in Europe, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* isolated mostly in Asia and *F. tularensis* subsp. *novicida,* non-pathogenic to humans. Due to its ability to infect and variable forms of the disease, the etiological agent of tularaemia is classified by the CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) as a biological warfare agent with a high danger potential (group A). The majority of data describing incidence of tularaemia in Poland is based on serological tests. However, real-time PCR method and MST analysis of *F. tularensis* highly variable intergenic regions may be also applicable to detection, differentiation and determination of genetic variation among *F. tularensis* strains. In addition, the above methods could be successfully used in molecular characterization of tularaemia strains from humans and animals isolated in screening research, and during epizootic and epidemic outbreaks.

1. Historical overview. 2. Characteristics and taxonomy of *F. tularensis.* 3. Morphology. 4. Culture media and conditions. 5. Biochemical properties. 6. Survivability and persistence of *F. tularensis.* 7. *F. tularensis* as a biological weapon agent. 8. Tularaemia vaccines. 9. Pathogenicity of *F. tularensis.* 10. Tularaemia treatment. 11. Laboratory diagnostics of *F. tularensis.* 12. Summary

***Francisella tularensis* – przegląd**

Streszczenie: *Francisella tularensis* została rozpoznana jako czynnik chorobotwórczy ludzi i zwierząt na początku XX wieku. Analizy biochemiczne i patogenne właściwości czynnika biologicznego pozwoliły na wyróżnienie 4 podgatunków przypisanych do różnych regionów geograficznych: wysoce zakaźny *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) występujący głównie w Ameryce Północnej, *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) z obszaru Starego Świata, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* izolowany głównie z Azji oraz *F. tularensis* subsp. *novicida,* niepatogenny dla ludzi. Pałeczka tularemii, ze względu na swoje zdolności infekcyjne oraz zdolność do wywoływania różnych postaci chorobowych, została zakwalifikowana przez CDC (Centrum Kontroli i prewencji Chorób, USA) jako potencjalny wysoce niebezpieczny czynnik broni biologicznej (Grupa A). Większość danych opisujących przypadki zachorowań na tularemię opartych jest na testach serologicznych. Jakkolwiek, technika real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) i MST (Multi Sequence Typing) jako analiza wysoce zmiennych obszarów międzygenowych *F. tularensis* może być zastosowana do wykrywania, różnicowania i określania wariantów genetycznych izolatów *F. tularensis.*techniki te mogą być również wykorzystywane w charakterystyce molekularnej pałeczek tularemii izolowanych od ludzi i zwierząt w badaniach przesiewowych oraz w ogniskach epizootyczno-epidemicznych.

1. Rys historyczny 2. Charakterystyka *F. tularensis* i systematyka taksonomiczna 3. Morfologia 4. Podłoża hodowlane i warunki wzrostu 5. Właściwości biochemiczne 6. Wytrzymałość i żywotność *F. tularensis* 7. *F. tularensis* jako czynnik broni biologicznej 8. Szczepionki przeciwko tularemii 9. Patogenność *F. tularensis* 10. Leczenie tularemii 11. Diagnostyka laboratoryjna *F. tularensis* 12. Podsumowanie

Key words: characteristic of etiological agent, diagnostic methods, *F. tularensis*, treatment, vaccination
Słowa kluczowe: charakterystyka czynnika etiologicznego, metody diagnostyki, *F. tularensis*, leczenie, szczepienia

1. Historical overview

Francisella tularensis was recognised as an agent of human and animals infection at the beginning of the 20th century [82]. It is thought that the tularaemia *F. tularensis* evolved simultaneously in the Old and New Worlds about 11 million years ago at the turn of Miocene and Pliocene [31]. Prior to the disease being recognised by McCoy in 1911, information about an unusual illness (called lemming fever) appeared in 1653 in Norway; in 1818 in Japan it was described as "Yato-byo" – wild hare disease [82]. Cases similar to tularaemia were also described in 1741 in Western Siberia, later in 1825 also in Astrakhan (Siberia, former Soviet Union) as "pestis minor" (1877–1879) („pestis minor", 1877–1879 but in 1908 in Utah (USA) it was recognised as "deerfly fever". In 1921 the disease, "polyadenitis", was found along the river Irtysh and in 1925 as "lymphadenitis" – an epidemic inflammation of lymph nodes – in the Voronez region (both former Soviet Union) [20, 28, 31, 84].

The first certain tularaemia cases in people were described in 1904 in California and in 1907 in Arizona [31]. Next cases were found in 1908 and 1910 in Utah; Pearse named them "deerfly fever". The infection was caused by a deerfly bite and symptoms appeared 3–5 days after the bite [84]. In 1911 in Tulare (Califor-

* Autor korespondencyjny: Dr. Agata Bielawska-Drózd, Biological Threats Identification and Countermeasure Centre of the General Karol Kaczkowski Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Lubelska 2, 24-100 Puławy Poland; tel. 81 261 519 816; e-mail: abielawska@wihe.pulawy.pl

nia, USA) a pestis-like rodent disease was described; it attacked field rodents and ground squirrels; lesions found in organs during autopses were similar to those caused by pestis [84]. In 1912 McCoy and Chapin isolated a Gram-negative bacterium and named it *Bacterium tularensis* [6, 20, 65, 84]. Later research classified the tularaemia bacterium as *Bacterium tularensis*, *Bacillus tularensis*, *Brucella tularensis*, *Pasteurella tularensis* [31]. In 1947–1959 the final agreement on the biological agent taxonomy was reached and the genus was named *Francisella* as a tribute to Dr Edwardow Francis [31].

During intensive research on *F. tularensis*, significant differences were found in symptoms in patients from North America and other parts of the world. The differences were related to the presence of two variable types of *F. tularensis* present in sub-arctic regions, and the second, found in Palaearctic. Further biochemical analyses and the biological agent's pathogenic properties allowed distinguishing 4 subspecies originating from different geographical regions: *F. tularensis nearctica* (mainly North America), *F. tularensis holarctica* (the Old World), in central Asia – *F. tularensis mediasiatica,* in Japan – *F. tularensis japonica.* Including *F. novicida* in a taxonomic group was problematic due to a limited known reservoir [31].

Basing on the research of sensitivity to erythromycin, two biovars were found within *holarctica* species: biovar I Ery^S – sensitive to erythromycin, and biovar II Ery^R – resistant. Moreover, strains originating from Japan were included in the third biovar: *F. tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica* Radionova. Finally, the descriptors of type A and B were accepted in *F. tularensis* subsp. *tularensis* and *F. tularensis* subsp. *holarctica* respectively [60, 82].

2. Characteristics and taxonomy of *F. tularensis*

F. tularensis belongs to the phylum *Proteobacteria*, class *Gammaproteobacteria*, order *Thiotrichales*, family *Francisellaceae* [33, 64]. Within the genus *Francisella*, 2 species were distinguished: *F. tularensis* and *F. philomiragia* [29, 33, 62, 63]. Taxonomy of *F. tularensis* according to *Bergey's Manual Systematic Bacteriology* [33, 46].

Kingdom:	*Bacteria*
Phylum:	*Proteobacteria*
Class:	*Gammaproteobacteria*
Order:	*Thiotrichales*
Family:	*Francisellaceae*
Genus:	*Francisella*
Species:	*Francisella philomiragia*
Species:	*Francisella tularensis*
Subspecies:	*Francisella tularensis* subsp. *tularensis*
	Francisella tularensis subsp. *holarctica*
	Francisella tularensis subsp. mediasiatica
	Francisella tularensis subsp. novicida

Moreover, it has been suggested that a subspecies *F. japonica* should be distinguished within the type B for the strains isolated in Japan [60, 87, 92] and that 4 species ought to be distinguished within the genus [77].

F. philomiragia previously called *Yersinia philomiragia* was isolated from water samples, muskrats and humans [39]. This species can be found mainly in water environment, i.e. in streams, rivers and lakes. It may cause infections in patients with supressed immune system [7]. It may also be found in various fish species [44, 45, 52, 61, 63].

Extensive research on the Francisella genus allowed describing new, previously unknown species such as *F. noatunesis* [77], *F. hispaniensis* [41], *F. guangzhouensis* [69], *F. halioticida* [8], *F. asiatica* [54] and *F. persica* [51].

3. Morphology

F. tularensis is a small (0.2–0.5 μm × 0.7 – 1.0 μm), non-spore forming single, Gram-negative coccobacillus staining weakly with Gram method [20]. Bilecki (1974) recommends using carbolfuchsin and crystal violet with an extended exposure up to 1.5 hours. For histological slides he recommends Giemsa method, also adopted for staining smears from cultures. Slides prepared in such way may show the bacteria stained pinkish-violet to purplish-blue. Cells from cultures only several days old will stain pink, bacteria from older cultures will show as navy blue. The methylene blue dyeing, Kozłowski method, Burry method may also be adopted for *F. tularensis* microscopy analysis. The Kozłowski technique allows to distinguish *F. tularensis* (stains green) from *Brucella* spp. (stains red). *F. tularensis* is characteristic for its bipolar staining [6].

4. Culturing media and conditions

F. tularensis has high nutritional requirements and needs cysteine-enriched culturing media [20, 64, 65]. One of them is blood agar with glucose and cysteine, another is chocolate agar with cysteine (CHAB) [20]. Moreover, culturing of *F. tularensis* is commonly done using cysteine agar with glucose, thioglycollate fluid medium, modified Theyer-Martin medium, buffered charcoal-yeast extract agar or cysteine agar with heart infusion and 9% sheep blood [20, 65]. On CHAB medium *F. tularensis* grows from 2 to 5 days at the temperature 35°C in the atmosphere of 5% CO_2, they form small (2–4 mm in diameter), smooth, round mucous colonies [18]. *F. tularensis* is highly pleomorphic. In animals highly susceptible to infection (mice) the

bacterium is thin, short and delicate. In organs taken from other animals, for example rabbits, it may be a coccus or a bacillus, but the predominant form is coccobacillus. Pleomorphism may also be observed in artifficial media. Bacilli dominate in fresh cultures, while in older ones mainly cocci are present. Liquid media show bipolar or curved forms frequently joined into threads with rounded ends. A theory has been formulated that there exists a connection between the morphology and level of infectiveness of the bacterium. Pleomorphism is absent in old colonies and in non-infectious strains and the bacteria present the form of a coccus. Among the bacteria found in animals susceptible to infection and in highly infectoius strains of *F. tularensis* the bacillus is dominated form [6].

Another medium which may be used successfully in culturing samples of *F. tularensis* collected from animals and environment is a cysteine medium with added antibiotics CHAB-A and CHAB-PACCV. The Center for Disease Control and Prevention USA (CDC) recommends CHAB as appropriate for culturing *F. tularensis* from clinical samples, despite other media such as blood agar and Theyer-Martin medium are also being used in the USA, [95]. Morris *et al.* (2017) proposed a novel broth medium (BVFH – BHI supplemented with 2% Vitox, 10% Fildes and 1% histidine). This medium enhanced growth of *F. tularensis* Type A1, A2 and B strains [58].

F. tularensis grows slowly at 37°C and very weakly at 28°C. This feature may be used to distinguish the tularaemia *F. tularensis* from *Y. pestis*, *F. philomiragia* and *F. tularensis* subsp. *novicida*, which show growth at 28°C [20]. Culturing tularaemia in the environment with 5% CO_2 may increase growth but it is not particularly significant. Colonies of *F. tularensis* subsp. *novicida* and *F. philomiragia* are slightly larger than *F. tularensis* [59, 64].

5. Biochemical properties

Biochemical properties of *F. tularensis* subspecies are slightly diferent. *F. tularensis* subsp. *tularensis* has the ability to ferment glycerol, glucose, maltose and citrulline. It is also very sensitive to erythromycin and other macrolide antibiotics and lincomycin. In comparison to *F. tularensis* subspecies *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *tularensis* presents a higher level of fatty acids C24 (12–16%). What is more, its antigen structures contain more hexosamine (6–12%) than *F. tularensis* subsp. *holarctica* (5–7%) [60]. *F. tularensis* subsp. *holarctica* has the ability to ferment glucose and maltose but not citrulline or glycerol (except for biovar *japonica*). These strains contain more fatty acids C14 (9–11%), but less C24 (7–11%) than other subspecies. Immunising laboratory animals with *F. tularensis* subsp. *holarctica* resulted in a lower level of protection against infections than when strains *F. tularensis* subsp. *tularensis* were used [60]. *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* was described by Aikimbaeva; it originates from the centre of the ex-soviet part of Asia. The strains from this subspecies ferment glycerol and citrullin but they show very weak fermentation ability towards glucose and maltose. They are very sensitive to macrolides and lincomycin. The research on fatty acids content showed low levels for C14 (4.2–4.5%) and, similarly to *F. tularensis* subsp. *tularensis*, high levels for C24 (12–16%) [60].

6. Survivability and persistence of *F. tularensis*

F. tularensis may survive many weeks in soil, animal carcasses and their skins, many months in water and silt and for years in frozen rabbit meat. It may survive in watercourses, which may constitute sources of local outbreaks. In North America the main sources of contamination of watercourses are beavers and musk rats, in Scandinavia beavers and lemmings, in the former USSR – rats and voles [38, 84]. Moreover, *F. tularensis* may be found as VBNC (Viable but non culturable state) [20, 38]. VBNC does not guarantee infectivity which was shown during attempts to infect a mouse with a suspension of cells [27]. It was also shown that *F. tularensis* is capable of replication in a free-living protozoan *Acanthamoeba castellanii* [1] similarly to *Legionella pneumophila* [80]. An interesting and not fully explained phenomenon is the existence of FLEs (*Francisella*-like endosymbionts) [20, 22, 42, 50, 78, 86, 94].

One of the main factors influencing *F. tularensis* development is temperature. The pathogen may survive in natural waters for up to 14 weeks at the temperature of 7°C and even up to 4 months at 4°C to 6°C. The temperatures of 20–21°C allow its survival for about 3 weeks. Mud is another environment conductive to the bacterium's survival (62 days); in humid soil it may live for up 30 days and in mud kept at the temperature of 7°C even up to 14 weeks [31]. According to Skrodzki [84], bacteria suspended in isotonic saline solution at 58°C die after 10 minutes [31, 84], at the temperature of 56°C – after 20 minutes, at 54°C after 1 hour. However, heating a suspension of bacterial cells to the temperature 50°C – 52°C does not deactivate the biological agent [84]. Other authors state that the bacteria die after 10 minutes in 56°C – 58°C [6, 31]. From the epidemiological and epizootic viewpoint, the crucial factor is the bacteria's survival in living organisms and dead tissues, where they can live for up to 93 days, and in liver for 53 days. The bacteria were also found after 90 days in mice kept at 0°C; in mice kept at room temperature they survived for up 15 days. In carcasses of dead hares kept in cold stores (–16°C to –20°C) the microorganism

survived for up to 120 days in solid organs and up to 75 days in muscles [84]. In tics it may live for up 700 to 764 days and in skins of animals kept at 15°C – 20°C it may survive for at least 20 days [31]. Moreover in vole skins dried at the temperature of 8°C – 12°C *F. tularensis* was found for up to 40 days, at 32°C the bacteria die after 5–6 days [84]. Research concerning survivability of *F. tularensis* was conducted, among others, by Bilecki [6], who discovered that *F. tularensis* found in vole skins exposed to sunlight at the temperatures of 24°C – 29.5°C survived for only 3 hours. Where the skins were dried in diffused light at the temperatures 17.5°C – 20°C, the bacteria were active for 30 hours and at 17°C – 18°C when dried indoors, the skins contained living bacteria for up to 20 days [6].

7. *F. tularensis* as an agent of biological weapon

Tularaemia was already known in 14th century B.C. in Central Anatolia (present day Turkey) during the region of Hittites. It is thought that the disease was brought to Anatolia from the Middle East when, as a result of wars and voyages, with infected rodents and ticks. The tularaemia outbreaks with many victims from varied social groups were observed in Syria, Egypt and Lebanon. Military use of *F. tularensis* was known as long ago as 1320–1318 B.C. when, during a war between Hittites and Arzawa in the Middle East, herds of infected sheep were driven by the Hittites behind the enemy's defence lines and, as a result, the Arzawan forces were greatly weakened by the disease [36].

In 1932 Japanese scientists initiated research on the possibility of using *F. tularensis* as an agent of biological weapon; this research was tested in paramedical experiments conducted by Unit 731 in Manchuria during the Second Sino-Japanese War (1937–1945) of World War II [38, 82]. In the mid-20th century both the USA and the USSR conducted extensive research on *F. tularensis* strains resistant to streptomycin. Moreover, a Soviet scientist Ken Alibek suggested a hypothesis of intentional *F. tularensis* use as an agent of biological weapon on the eastern front during WW II (the Battle of Kursk). He also disclosed that the Soviets continued the research on biological warfare until the 1990s, as a result of which antibiotic-resistant and vaccine-resistant strains may have been created [2, 20, 38, 80, 82].

Extensive research on humans and animals was also conducted by USAMRIID (United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick, Maryland). For the research purposes aerosol chamber was used; there the effectiveness of preventive therapies and vaccines was tested on infected volunteers.

In 1972 Convention on the Prohibition of the Development, Production, and Stockpiling of Bacteriological and Toxin Weapons was implemented [54]. The convention was accepted by 140 countries; in spite of this, however, the number of countries possessing hazardous biological agents has been steadily increasing. This increase constitutes a threat demanding continuous research on the potential results of releasing biological agents, on symptoms, pathomechanisms, human immunological responses and appropriate treatments, vaccinations and other possible defensive actions [49].

8. Tularaemia vaccine

Extensive studies of *F. tularensis*, particularly in the USA and former USSR, resulted in the commencement of research on an effective tularaemia vaccine. Observations of initial infections with *F. tularensis* showed that the following infections were much milder [82].

First vaccines used cellular extracts of *F. tularensis*. They proved to be ineffective, however, and caused strong reactions in the vaccinated organisms. The induced immunoresponse allowed to reduce the symptoms of ulceroglandular and typhoidal tularaemia in volunteers, but many presented symptoms of the acute form of the disease. Similar trials done on animals did not result in noticeable therapeutic effects. Infections with low virulence strains can be defeated by antibodies and immunity against highly virulent strains of *F. tularensis* is provided by T cells. One of the target units potentially useful in therapy is LPS, which may induce immunoresponse against low virulence strains and extend the survival of immunised mice [64].

In the 1930s and 1940s there were extensive studies aimed at finding a strain suitable to produce a vaccine. As a result, in the USSR a Live Vaccine Strain (LSV) was produced; it caused a satisfactory immunoresponse in organisms [38]. LVS was tested on humans during Operation Whitecoat. Two routs of administration of the vaccine are known: via aerosol or scarification. Aerosol application caused more effective immunity, however in most cases scarification was used [64]. First human testing was done in 1942. Six months after the vaccination volunteers were infected with *F. tularensis* virulent strains. The experiments confirmed usefulness of this strain for the purpose of immunisation against tularaemia [82]. In 1946 in the USSR a programme of preventive vaccinations against tularaemia was initiated; an attenuated vaccine was used. At the end of the 1950s tens of millions of inhabitants of endemic areas were inoculated. The Russian vaccine resulted in immunity for the period of at least 5 years, in some cases from 10–15 years [23]. Among the vaccinated only 0.36% showed tularaemia symptoms, in the non-vaccinated population the disease incidence was 4.3% [38].

Presently LVS of *F. tularensis* is not officially approved for use. One of the reasons may be variable cell morphology and immunogenicity. Moreover, there is not much information regarding the mechanisms of the strain attenuation. Despite these unknowns however, attenuated LVS may induce immunoresponse resulting in immunity to tularaemia. This phenomenon proves that a strain selected for its particular genetic features and a rationally prepared vaccination strain may be useful in research on a potential vaccine. The strain used ought to be non-virulent and to be capable of replication *in vivo* with a limited ability to survive, so no disease symptoms would result [57].

ISCOMS – Immune Stimulating Complexes and CpG as a new adjuvants are very hopeful [64]. Currently used vaccines are available on a limited scale only, live attenuated vaccines are available in Russia (LVS) and the USA. Apart from that several others are being tested: attenuated, killed and subunit vaccines [53, 64].

9. Clinical forms of tulareamia

Pathomechanism virulence factors and interactions between the host and the pathogen were widely discussed. Clinical forms of tularaemia and its course depend on many factors: virulence potential of the bacterium, the path of contact with organism the infectious dose, the disease course in the human body and the immunological status of the host. The effect may be a nearly symptomless form of tularaemia, but in some cases sepsis and sudden death may result. The incubation period of disease is between 3 to 5 days (sometimes up to 21 days) [20, 65, 70, 88] or from 1 to 14 days [88]. The onset of tularaemia is usually sudden, with high fever, shivers, headache, apathy, general fatigue, weakness, vomiting and conjunctivitis [65, 70, 71, 88]. Other symptoms may also be present, such as cough, chest discomfort, stomachache and diarrhoea. There exist several clinical forms of tularaemia: ulceroglandular, glandular, oculoglandular, oropharyngeal, pneumonic, intestinal and typhoidal [6, 31, 47, 48, 57, 65, 70, 71, 84, 88].

The ulceroglandular form constitutes from 45% to 85% of all tularaemia cases [70, 71]. Most commonly it results from an infected bite. Symptoms commonly appear between 3 to 6 days after infection, later an ulcer forms. During illness the patient may suffer from flu-like symptoms, including fever (38°C – 40°C), headache, chills and general fatigue [57]. Skin lesions may appear before, during or from one to a few days following adenopathy as red, painful pustules in the area of lymph nodes. There may also appear blisters resembling a herpes simplex varicella-zoster infection. Skin lesions may necrotise, forming ulcers with raised edges. If no treatment is undertaken, the ulcers may be present for weeks and result in scarring. The site of ulceration depends on the rout of infection in case of animal contact, palms and forearms are affected; after a tick bite ulceration is present on the torso, crotch, legs, head and neck. Lymphadenopathy location also depends on pathogenesis. Neck and nape adenopathy is most common in children; adults usually suffer from groin adenopathy. Skin lesions appearing over adenopathies, observed in 19.1% cases in Sweden, suggest suppuration. Lymphadenopathy is uncommon, but may accompany this disease form especially in cases of secondary infections of the initial ulceration with other bacteria [63]. Skin lesions may also present as black pustule surrounded by erythema and swelling. Infected lymph nodes may be the source of pathogen penetrating other organs and tissues, such as liver, spleen, intestines, kidneys, central nervous system and skeletal muscles. Often hyperbilirubinemia can be observed (including elevated levels of liver transaminases) and leukocitosis [70]. Unless antibiotics are given, lymph nodes may swell within 7–10 days and suppuration may follow. This may occur in 30–40% of cases and is one of the most serious complications of infections by *F. tularensis* subsp. *holarctica.* The ulceroglandular is the dominant form of the disease and constitutes more than 90% of tularaemia cases in Europe. Other subspecies of *F. tularensis* may also cause this form of the disease [82]. Frequently observed large swelling of lymph nodes may resemble bubonic plague. Glandular form does not present ulceration or suppuration; the form with fever but showing no lymphadenopathy is described as typhoidal or septic [57].

Oculoglandular form is a localised form of glandular tularaemia (Gałęzowski-Parinoud syndrome), initially described by a Polish ophthalmologist Gałęzkowski working in France and a Frenchman Pairnaud. It was also described in Poland.

Glandular form occurs in patients with a local lymphadenopathy, but lacking visible skin lesions. Such form occurs in the USA in fewer than 20% of cases. The glandular form develops similarly to the ulceroglandular type except for the development of skin lesions which may not occur at all or be minimal, atypical or unnoticed. Both glandular and ulceroglandular forms may present suppuration in lymph nodes. Suppuration is present in more than 20% of cases if no therapy with antibiotics is undertaken or if antibiotics are administered after the first two weeks of illness. The form of tularaemia with suppurating lymph nodes should be distinguished from: infections by *Streptococcus pyogenes*, cat scratch disease, syphilis, chancroid, lymphogranuloma venereum, tuberculosis, mycobacterial infections, tokxplasmosis, sporotrichosis, rat-bite fever, anthrax, plague and herpes simplex infections [65].

The oropharyngeal form constitutes only several percent of cases and is associated mainly with intenstinal infections by contaminated food or water [64, 65]. It may be a variant of the ulceroglandular form [65]. A typical symptom is ulcerating and exudative stomatitis with or without tonsillitis. In the mouth and throat area ulceration may form causing pustules. Large cervical lymphadenopathy is usually one-sided, rarely symmetrical. Late commencement of treatment may result in suppuration, as it was observed in Turkey in 40% of oropharyngeal form of cases [65, 88]. In the pharyngeal form the main symptoms are high fever and acute throat ache. Some patients may show lesions on mucous membranes of the larynx, resembling diphtheria. In differential diagnosis streptococcal pharyngitis, mononucleosis, diphtheria and adenovirus infections should be considered. The suspicion of pharyngeal tularaemia should be taken under consideration in endemic regions and in patients with acute throat ache in the cases where penicillin treatment was unsuccessful and routine diagnostic tests showed no satisfactory results [65].

Pulmonary and septic forms of tularaemia, caused by *F. tularensis* subsp. *tularensis*, are the most dangerous disease forms with average mortality rates on 30–60%. Both forms may develop from ulceroglandular or glandular tularaemia, but the pulmonary form mainly follows infection by inhalation [57]. This form may manifest as typical pneumonia with cough, chest pains and elevated breathing frequency. High fever, nausea and vomiting may also be present as additional symptoms [88].

Significant differences in symptoms caused by A and B types of *F. tularensis* are well illustrated by the pulmonary type. Infections with the A type show fast decline in health with sudden chills, high fever, shortness of breath, dry or wet cough, chest pains, sweating, sleepiness and general fatigue [88]. Research from 1950s conducted on volunteers exposed to aerosol infection showed that the pulmonary form develops 3 to 5 days following the exposure [18]. High fever, up to 40°C, is a characteristic symptom. Other symptoms resemble pneumonia: bradycardia, chills, shortness of breath and dry cough. Headache, throat ache, muscular pains and nausea are also present. Frequently observed haemorrhagic airway inflammation may lead to bronchopneumonia [57]. The pulmonary form should be distinguished from pneumonia caused by *Mycoplasma* spp., *Legionella* spp., *Chlamydophila pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia psittaci*, *Mycobacterium tuberculosis*, pulmonary plague and others [66]. Intestinal tularaemia follows ingestion of contaminated food or water and may lead to gastritis and inflammation of intestines. This form may show symptoms from mild diarrhoea up to acute form with numerous ulcerations of the intestines [70, 71]. Typhoidal tularaemia is uncommon [70]. It may develop following an infection via any of the possible paths of contact with microorganisms and it is the hardest to diagnose. In many patients it has a very serious form, from extreme exhaustion to sudden death. The main symptoms are fever with chills, headache, muscular pains, throat ache, nausea, vomiting, diarrhoea, stomachache, cough. Patient examination will show dehydration, lowered blood pressure, mild pharyngitis, cervical adenopathy, meningismus, increased muscle tone of stomach muscles. Hepatomegaly and splenomegaly are also encountered in acute cases of the disease and the risk of these increases with the progress of the disease [65]. The onset of the disease can be sudden (fever 38°C – 40°C). One of the symptoms is breakdown of skeletal muscles (rhabdomyolysis), morbidity in such cases reaches 50% [70, 71]. Typhoidal tularaemia should be distinguished from: typhoid fever (infection with *Salmonella typhi*), typhus fever (*Rickettsia provazekii*), infections with *Brucella* spp., *Legionella* spp., *C. burnetii,* mycobacteria, fungi, rickettsiae, *Plasmodium* spp. [65].

Among the diseases which should be differentiated from the ulceroglandular form, the following should be mentioned: skin lesions caused by *Staphylococcus* and *Streptococcus* infections, anthrax, pasteurellosis, tuberculosis, lymph node tuberculosis, infections with mycobacteria and rickettsiae, toxoplasmosis, cat scratch disease, plague, and viral infections with HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), CMV (*Cytomegalovirus*) and EBV (*Epstein-Barr Virus*). Pulmonary tularaemia may present similarly to acute brucellosis, *Hantavirus* infections, leptospirosis, flu, *M. Pneumoniae* infection, Legionairres' disease, TWAR (*Chlamydia trachomatis pneumonia*), psittacosis, anthrax, Q fever, plague, SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) [88] and MERS -CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) and some deep mycoses. In tularaemia transmission the arthropods bite may pay important role [25, 30, 47, 72, 91, 94, 96].

10. Tularaemia treatment

In acute tularaemia cases in adults where hospital admission is deemed necessary, parenteral administration of aminoglycosides is recommended gentamicin dosed 5 mg/kg/day is preferred; it should be divided into two doses and the concentration of the antibiotic in the serum should be monitored. Alternatively, streptomycin may be administered as an intramuscular injection given twice daily at 2 g/day for 10 days. In extremely severe cases the period of treatment will depend on the organism's response and it may extend much further than 10 days. In less extreme cases or when mass attack is suspected, oral administration of ciprofloxacin is preferred at 800–1000 mg/day,

intravenously in two doses; the period of treatment should be between 10–14 days. Doxycycline is also possible, given orally in two doses at 200 mg/day for no fewer than 15 days [86].

In the studies carried out by Grossman *et al.* (2017) the synthetic fluorocycline TP-271 was tested in outbreak events of aerolized exposure to *F. tularensis* for complicated inhalational infections [34].

In children requiring hospital treatment, parenteral administration of aminoglycosides is preferred, with gentamicin being the drug of choice at 5–6 mg/kg/day divided into two or three doses; the concentration of the antibiotic in the serum should be monitored. Alternatively, streptomycin can be administered at 15 mg/kg/day in two doses (maximally 2 g of the antibiotic per day). In milder cases caused by *F. tularensis,* type B which may occur in endemic areas, ciprofloxacin may also be used at the dosage of 15 mg/kg/day (maximally 1 g/day) [95].

In pregnant women it is necessary to consider possible side effects of treating severe infections. Despite gentamicin and ciprofloxacin not being admitted by the FDA (Food and Drug Administration, USA) to use in tularaemia infections treatment in pregnant women, these antibiotics are recommended by Johns Hopkins Working Group on Civilian Biodefense [18]. The dosage is identical with the dosage recommended for non-pregnant women and the treatment period should be decided on an individual basis [95].

Not much information is available for the patients with compromised immunological systems. Aminoglycosides should be the drug of choice, alternatively ciprofloxacin can be given. The dosage is similar to the patients with stable immunological systems and the treatment period may be up to 14 days. In cases requiring extended treatment, initial administration of aminoglycosides may be supplemented by oral or parenteral administration of ciprofloxacin [95]. Significant categorisation of tularaemia treatments in various population groups was presented by Dennis *et al.* [18].

11. Laboratory diagnostics of *F. tularensis*

F. tularensis as a facultative intracellular pathogen may be cultured on artificial media. One of them is CHAB (cysteine heart agar with blood), containing cysteine [55, 66, 67, 93], another is BCYE (buffered charcoal yeast extract) [56, 73, 74], also used as a selective medium in *L. pneumophila* culturing [14, 15]. Other media successfully used in culturing of *F. tularensis* are as follows: McCoy and Chapin, Francis, Cystine Heart Agar and fluid thioglycollate medium [84]. Recently two new selective media have been developed on the base of CHAB [59, 66]; they may be used to obtain and multiply *F. tularensis* from contaminated solid tissues. The CHAB – A medium contains colistin, amphotericin, lincomycin, trimethoprim and ampicillin [66]. CHAB – PACCV, also successful in culturing *F. tularensis* from environmental samples, contains polymyxin B, amphotericin B, cycloheximide, cefepime and vancomycin [59]. Serological methods are most commonly used in laboratories confirming tularaemia diagnoses, with ELISA being the most popular method [11, 12, 13, 68, 76, 79]. Among others there are microagglutination tests [15, 68], immunochromatographic tests [12], Western blot tests [12, 68, 76], a micromatrix method [11] and an indirect immunofluorescence method [68].

Using a PCR (Polymerase Chain Reaction) method enables detection of *F. tularensis* genetic material in both clinical and environmental samples. The method is an essential tool in detection of microorganisms difficult to culture. For identification of species with a real time PCR technique, the most convenient nucleotide sequences are the genes *fopA* and *tul4*, coding the proteins of the external membrane of the *F. tularensis* cells [4, 5, 13, 21, 32, 37, 50, 81, 95]. In order to distinguish the type A from type B and other subspecies, the recommended PCR techniques should be aimed to detect the following genes: *pdpD* (present in type A *F. tularensis,* and missing in type B and *novicida*), *ISFtu2,* absent in type A and *novicida* [50], the gene coding 23 kDa protein [19, 83, 92, 93], *lpnA* (*tul4*) coding 17 kDa protein [10, 89]. For further detailed analyses within the species *F. tularensis* a real-time PCR technique has been developed which allows differentiation of subtypes A.I. and A.II. The goal sequences are RDs (Regions of differences) [87]. Another method allowing for differentiation within the species and subspecies is detection and sequencing of the genes 16S rRNA [17, 28, 50, 81].

12. Summary

Due to low infectious dose, high virulence, invasion and variable forms of the disease, the etiological agent of tularaemia is classified by the CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) as a potentially highly dangerous agent of biological weapons (group A). Moreover, a broad distribution of the pathogen's reservoir makes *F. tularensis* a serious threat to human life and health. Clinical presentation of tularaemia varies largely and therefore poses diagnosis problems; in effect the number of tularaemia cases may go underreported. Diagnostics of tularaemia in Poland is mainly based on serological analyses and therefore not fully satisfactory due to the low specificity of serological methods resulting from an extremely high diversity among the *F. tularensis* species. As an alternative to these methods, genetic techniques may be used successfully in molecu-

lar characterisation of tularaemia strains isolated from humans and animals in screening research and during epizootic and epidemic outbreaks.

References

1. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandström G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microb.* **69**, 600–606 (2003)
2. Alibek K.: The Soviet Union's Anti-Agricultural Biological Weapons. *Ann. N.Y.* Acad. *Sci*. **894**, 18–19 (1999)
3. Barns S.M., Grow C.C., Okinaka R.T., Keim P., Kuske C.R.: Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microb.* **71**, 5494–5500 (2005)
4. Bielawska-Drózd A., Gaweł J., Bartoszcze M., Kołodziej M., Graniak G., Joniec J., Michalski A.: Identification of *Francisella tularensis* by real-time PCR with TaqMan probes. *Lek. Wojsk*. **2**, 98–102 (2011)
5. Bielawska-Drózd A., Niemcewicz M., Gawel J., Bartoszcze M., Graniak G., Joniec J., Kołodziej M.: Identyfikacja *Francisella tularensis* techniką real-time PCR z wykorzystaniem sond hybrydyzujących zaprojektowanych dla fragmentów sekwencji genów *fopA* i *tul4*. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **62**, 351–360 (2010)
6. Bilecki Ś.: Tularemia. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa, 1974
7. Birkbeck T.H., Bordevik M., Frøystad M.K., Baklien Å.: Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, Salmo salar L., in Chile. *J. Fish Dis.* **30**, 505–507 (2007)
8. Brevik O.J., Ottem K.F., Kamaishi T., Watanabe K., Nylund A.: Francisella halioticida sp. Vov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* **5**, 1044–1056 (2011)
9. Broman T., Thelaus J., Andersson A.C., Bäckman S., Wikström P., Larsson E., Forsman M.: Molecular detection of persistent *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in natural waters. *Int. J. Microbiol.* DOI: 10.1155/2011/851946 (2010)
10. Byström M., Böcher S., Magnusson A., Prag J., Johansson A.: Tularemia in Denmark: identification of a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strain by real-time PCR and high-resolution typing by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5355–5358 (2005)
11. Carlsson H.E., Lindberg A.A., Lindberg G., Hederstedt B., Karlsson K.A., Agell B.O.: Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 615–621 (1979)
12. Chaignat V., Djordjevic-Spasic M., Ruettger A., Otto P., Klimpel D., Müller W., Tomaso H.: Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect. Dis.* **14**, 234 (2014)
13. Chróst A., Gielarowiec K., Kałużewski S., Rastawicki W. Występowanie zakażeń wywoływanych *przez Francisella tularensis* u ludzi w Polsce oraz laboratoryjna diagnostyka tularemii. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **69**, 55–63 (2017)
14. Cianciotto N.P., Fields B.S.: *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci*. USA, **89**, 5188–5191 (1992)
15. Cirillo J.D., Falkow S., Tompkins L.S.: Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* **62**, 3254–3261 (1994)
16. Croddy E., Krcalova S.: Tularemia, biological warfare, and the battle for Stalingrad (1942–1943). *Mil. Med.* **166**, 837–838 (2001)
17. Del Blanco N.G., Dobson M.E., Vela A.I., De La Puente V.A., Gutierrez C.B., Hadfield T.L., Ferri E.R.: Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2964–2972 (2002)
18. Dennis D.T., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Tonat K.: Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. **285**, 2763–2773 (2001)
19. Dentan C., Pavese P., Pelloux I., Boisset S., Brion J.P., Stahl J.P., Maurin M.: Treatment of tularemia in pregnant woman, France. *Emerg. Infect. Dis*. **19**, 996–998 (2013)
20. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W.: Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev*. **15**, 631–646 (2002)
21. Emanuel P.A., Bell R., Dang J.L., McClanahan R., David J.C., Burgess R.J., Hadfield T.: Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. *J. Clin. Microbiol*. **41**, 689–693 (2003)
22. Escudero R., Toledo A., Gil H., Kovácsová K., Rodríguez-Vargas M., Jado I., Anda P. Molecular method for discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3139–3143 (2008)
23. Fedorowa V.A., Sayapina l.V., Corbel M.J., Motin V.L.: Russian vaccines against especially dangerous bacterial pathogens. *Emerg. Microbes Infect.* **3**, DOI:10.1038/emi.2014.82 (2014)
24. Fong I.W., Alibek K.: Bioterrorism and infectious agents: a new dilemma for the 21st century (Vol. 4) (w) Tularemia and Bioterrorism, Chapter 3, red. L. Hodges, R.L. Penn, Springer Science & Business Media, Berlin, 2005, s. 71–98
25. Formińska K., Zasada A.A., Rastawicki W., Śmietańska K., Bander D., Wawrzynowicz-Syczewska M., Yanushevych M., Niściogórska-Olsen J., Wawszczak M.: Increasing role of arthropod bites in tularemia transmission in Poland – case of reports and diagnostic methods. *Ann. Agric. Environ. Med.* **22**, 443–446 (2015)
26. Formińska K., Zasada A.A.: *Francisella tularensis* – podstępny patogen. *Post. Mikrobiol.* **56**, 187–195 (2017)
27. Forsman M., Henningson E.W., Larsson E., Johansson T., Sandström G. *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Ecol.* **31**, 217–224 (2000)
28. Forsman M., Sandström G., Jaurin B.: Identification of *Francisella* species and discrimination of type A and type B strains of *F. tularensis* by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microb.* **56**, 949–955 (1990)
29. Forsman M., Sandstrom G., Sjöstedt A.: Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Microbiol.* **44**, 38–46 (1994)
30. Franke J., Fritzsch 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**, 6829–6836 (2010)
31. Friend M.: Tularemia. U.S. Geological Survey, Reston, 2006, s. 1–68
32. Fujita O., Tatsumi M. Tanabayashi K., Jamada A.: Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59,** 46–51 (2006)
33. Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G.: Taxonomic Outline of the Procaryotes Release 5.0. Bergey's Manual of and Systematic Bacteriology, 2nd ed, Springer, 2004
34. Grossman T.H., Anderson M.S., Christ D., Gooldy M., Henning L.N., Heine H.S., Kindt M.V., Lin W., Siefkas-Patterson K., Radclitt A.K., Tam, V.H. Sutclifle J.H. The fluorocycline TP-271 is efficacious in models of aerosolized *Francisella tularensis* SCHU S4 infection in BALB/c mice and cynomolgus macaques. *Antimicrob. Agents and Ch.* doi:10.1128/AAC.00448-17 (2017)

35. Gunnell M.K., Robinson R.A., Adams B.J.: Natural selection in virulence genes of *Frnacisella tularensis*. *J. Mol. Evol.* **82**, 264–278 (2016)
36. Gürcan Ş.: Epidemiology of Tularemia. *Balk. Med. J.* **31**, 3–10 (2014)
37. Higgins J.A., Hubalek Z., Halouzka J., Elkins K.L., Sjöstedt A., Shipley M., Ibrahim M.S.: Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**, 310–318 (2000)
38. Hodges L., Penn R. L.: Tularemia and bioterrorism (w) Bioterrorism and infectious agents: A new dilemma for the 21st century, red. I.W. Fong, Kenneth Alibek, Springer, New York, 2005, s. 71–98
39. Hollis D.G., Weaver R.E., Steigerwalt A.G., Wenger J.D., Moss C.W., Brenner D.J.: *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1601–1608 (1989)
40. Hubalek Z., Rudolf, I.: *Francisella tularensis* prevalence and load in Dermacentor reticulatus ticks in an endemic area in Central Europe. *Med. Vet. Entomol.* **31**, 234–239 (2017)
41. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Splettstoesse W.D.: Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated 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. Evol. Micr.* **60**, 1887–1896 (2010)
42. Ivanov I.N., Mitkova N., Reye A.L., Hübschen J.M., Vatcheva-Dobrevska R.S., Dobreva E.G., Muller C.P.: Detection of new *Francisella*-like tick endosymbionts in *Hyalomma* spp. and *Rhipicephalus* spp.(Acari: Ixodidae) from Bulgaria. *Appl. Environ. Microb.* **77**, 5562–5565 (2011)
43. Jones C.L., Napier B.A., Sampson T.R., Llewellyn A.C., Schroeder M.R., Weiss D.S.: Subversion of host recognition and defense systems by *Francisella* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76,** 383–404 (2012)
44. Kamaishi T., Fukuda Y., NishiJama M., Kawakami H., Matsu-Jama T., Yoshinaga T., Oseko N.: Identification and pathogenicity of intracellular *Francisella* bacterium in three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Fish Pathology*. **40**, 67–72 (2005)
45. Kay W., Petersen B.O., Duus J.Ø., Perry M.B., Vinogradov E.: Characterization of the lipopolysaccharide and β-glucan of the fish pathogen *Francisella* victoria. *FEBS J.* **273**, 3002–3013 (2006)
46. Keim P., Johansson A., Wagner D.M.: Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. NY. Acad. Sci*. **1105**, 30–66 (2007)
47. Kłapeć T., Cholewa A.: Tularemia – wciąż groźna choroba. *Med. Og. Nauk Zdr.* **17**, 155–160 (2011)
48. Knap J. Tularemia (Tularaemia) (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. 6th ed., red. W. Magdzik D. Naruszewicz-Lesiuk, A. Zieliński, α-medica press, Bielsko-Biała, 2007 s. 312–317
49. Kocik J. Tularemia (w) Bioterroryzm. Zasady postępowania lekarskiego, red. K. Chomiczewski, J. Kocik, M.T. Szkoda, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 2002, s. 142–152
50. Kugeler K.J., Gurfield N., Creek J.G., Mahoney K.S., Versage J.L., Petersen J.M.: Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR. *Appl. Environ. Microb.* **71**, 7594–7597 (2005)
51. Larson M.A., Nalbantoglu U., Dayood K., Zentz E.B., Cer R.Z., Iwen P.C., Francesconi S.C., Bishop-Lilly K.A., Mokashi V.P., Sjosted A., Hinrischs 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)
52. Manuel M.J., Soto E., Moralis J.A., Hawke J.: A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *J. Aquat. Anim. Health.* **19**, 27–34 (2007)
53. Maron M.E., Barry E.M.: Live attenuated tularemia vaccines: recent development and future goal. *Vaccine* **31**, 3485–3491 (2013)
54. Mikalsen J., Colquhoun D.J.: *Francisella asiatica* sp. nov. isolated from farmed tilapia (*Oreochromis sp.*) and elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to species rank as *Francisella noatunensis* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* DOI:10.1099/ijs.0.002139-0 (2009)
55. Mikalsen J., Olsen A.B., Tengs T., Colquhoun D.J.: *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (Gadus morhua L.). *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **57**, 1960–1965 (2007)
56. Mitchell J.L., Chatwell N., Christensen D., Diaper H., Minogue T.D., Parsons T.M., Weller S.A.: Development of real-time PCR assays for the specific detection of *Francisella tularensis* ssp. *tularensis*, *holarctica* and *mediaasiatica*. *Mol. Cell. Probes*. **24**, 72–76 (2010)
57. Mitchell S.L., Griffin K.F., Titball R.W.: Tularemia pathogenesis and immunity (w) Microorganisms and Bioterrorism, Springer, New York, 2006 s. 121–137
58. Morris B.J., Buse H.Y., Adcock N.J., Rice E.W. A novel broth medium for enhanced growth of *Francisella tularensis. Lett. Appl. Microbiol*. **64**, 394–400 (2017)
59. Nano F., Elkins K.: The Genus *Francisella.* Chapter 3.3.44, *Procaryotes*. **6**, 1119–1132 (2003)
60. Olsufjev N.G., Meshcheryakova I.S.: Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int. J. Syst. Evol. Micr*. **13**, 872–874 (1983)
61. Ostland V.E., Stannard J.A., Creek J.J., Hedrick R.P., Ferguson H.W., Carlberg J.M., Westerman M.E.: Aquatic *Francisella*-like bacterium associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrsops* × *M. saxatilis*. *Dis. Aquat. Organ.* **72**, 135–145 (2006)
62. Ottem K.F., Nylund A., Karlsbakk E., Friis-Møller A., Krossøy B., Knappskog D.: New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). *Arch. Microbiol*. **188**, 547–550 (2007)
63. Ottem K.F., Nylund A., Karlsbakk E., Friis-Møller A., Kamaishi T.: Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1231–1243 (2009)
64. Oyston P.C.: *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *J. Med. Microbiol*. **57**, 921–930 (2008)
65. Penn R.L.: *Francisella tularensis* (Tularemia) (w) Principles and Practice of Infectious Diseases, red. L. Gerald, J.E. Mandell, R.D. Bennett, D. Mendel, Bennett, 7th ed. Churchill Livingstone, Elsevier, 2010, volume 2, s. 2927–2950
66. Petersen J.M., Schriefer M.E., Carter L.G., Zhou Y., Sealy T., Bawiec D., Chu M.C.: Laboratory analysis of tularemia in wild-trapped, commercially traded prairie dogs, Texas, 2002. *Emerg. Infect. Dis*. **10**, 419–425 (2004)
67. Petersen J.M., Schriefer M.E., Gage K.L., Montenieri J.A., Carter L.G., Stanley M., Chu M.C.: Methods for enhanced culture recovery of *Francisella tularensis*. *Appl. Environ. Microb.* **70,** 3733–3735 (2004)
68. Porsch-Özcürümez M., Kischel N., Priebe H., Splettstösser W., Finke E.J., Grunow R.: Comparison of enzyme-linked immu-

nosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 1008–1015 (2004)
69. Qu P.H., Chen S.Y., Scholz H.C., Busse H.J., Gu Q., Kämpfer P., Yang Z.C.: *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int. J. Syst. Evol. Micr*. **63**, 3628–3635 (2013)
70. Rastawicki W., Jagielski M.: Tularemia. *Post Mikrobiol.* **44**, 265–273 (2005)
71. Rastawicki W.: Tularemia (Tularaemia) (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka, 7th ed., red. A. Bauman-Popczyk, M. Sadkowska-Todys, A. Zieliński, α-medica press, Bielsko-Biała, 2014, s. 423–433
72. Reis C., Cote M., Paul R.E., Bonnet S. Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**, 907–916 (2011)
73. Rydzewski K., Schulz T., Brzuszkiewicz E., Holland G., Lück C., Fleischer J., Heuner K.: Genome sequence and phenotypic analysis of a first German *Francisella* sp. isolate (W12-1067) not belonging to the species *Francisella tularensis*. *BMC Microb*. **14**, 169 (2014)
74. Santic M., Akimana C., Asare R., Kouokam J.C., Atay S., Kwaik Y.A.: Intracellular fate of *Francisella tularensis* within arthropod--derived cells. *Environ. Microb*. **11**, 1473–1481 (2009)
75. Sato T., Fujita H., Ohara Y., Homma M.: Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2372–2374 (1990)
76. Schmitt P., Splettstoesser W., Porsch-Özcürümez M., Finke E.J., Grunow R.A.: Novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol. Infect.* **133**, 759–766 (2005)
77. Schrallhammer M., Schweikert M., Vallesi A., Verni F., Petroni G.: Detection of a novel subspecies of *Francisella noatunensis* as endosymbiont of the ciliate *Euplotes raikovi*. *Microbial Ecology*. **61**, 455–464 (2011)
78. Scoles G.A. Phylogenetic analysis of the *Francisella*-like endosymbionts of *Dermacentor* ticks. *J. Med. Entomol.* **41**, 277–286 (2004)
79. Sharma N., Hotta A., Jamamoto Y., Fujita O., Uda A., Morikawa S., Tanabayashi K.: Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vaccine Immunol.* **20**, 9–16 (2013)
80. Sinclair R., Boone S.A., Greenberg D., Keim P., Gerba C.P.: Persistence of category A select agents in the environment. *Appl. Environ. Microb*. **74**, 555–563 (2005)
81. Sjöstedt A., Eriksson U., Berglund L., Tärnvik A.: Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35,** 1045–1048 (1997)
82. Sjöstedt A.: Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. NY Acad.* **1105,** 1–29 (2007)
83. Skottman T., Piiparinen H., Hyytiäinen H., Myllys V., Skurnik M., Nikkari S.: Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. **26**, 207–211 (2007)
84. Skrodzki E.: Tularemia. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa, 1978
85. Steiner D.J., Furuya Y., Jordan M.B., Metzger D.W.: Protective role for macrophages in respiratory *Francisella tularensis* infection. *Infect. Immun*. **85**, e00064-17 (2017)
86. Sun L.V., Scoles G.A., Fish D., O'Neill S.L. *Francisella*-like endosymbionts of ticks. *J. Invertebr. Pathol.* 76(4), 301–303 (2000)
87. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A.: Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* **187**, 3903–3908 (2005)
88. Tärnvik A., Sandström G., Sjöstedt A. Epidemiological analysis of tularemia in Sweden 1931–1993. *FEMS Immunol. Med. Mic.* **13**, 201–204 (1996)
89. Thelaus J., Andersson A., Broman T., Bäckman S., Granberg M., Karlsson L., Forsman M.: *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* occurs in Swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding. *Micro. Ecol.* **67**, 96–107 (2014)
90. Titball R.W., Petrosino J.F.: *Francisella tularensis* genomics and proteomics. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1105**, 98–121 (2007)
91. Tomanowić S., Radulović Z., Masuzawa T., Milutinović M. Coexistence of emerging bacterial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Serbia. *Parasitic Zoonoses in Europe*. **17**, 211–217 (2010)
92. Tomaso H., Scholz H.C., Neubauer H., Al Dahouk S., Seibold E., Landt O., Splettstoesser W.D.: Real-time PCR using hybridization probes for the rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol. Cell Probe*. **21**, 12–16 (2007)
93. Versage J.L., Severin D.D., Chu M.C., Petersen J.M.: Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5492–5499 (2003)
94. Wójcik-Fatla A., Zając V., Sawczyn A., Cisak E., Sroka J., Dutkiewicz J. Occurrence of *Francisella* spp. in *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland. *Ticks Tick--Born Dis.* **6**, 253–257 (2005)
95. World Health Organization: Tularemia, https://www.cdc.gov/tularemia/diagnosistreatment/index.html. (26.09.2017)
96. Zhang F., Liu W., Wu X.M., Xin Z.T., Zhao Q.M., Yang H., Cao W. C. Detection of *Francisella tularensis* in ticks and identification of their genotypes using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *BMC Microbiology*, **8**, 152 (2008)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 68–75
http://www.pm.microbiology.pl

NOCARDIA SPP. – CHARAKTERYSTYKA, CHOROBOTWÓRCZOŚĆ, LECZENIE

Michał Wiciński, Kamil Leis*, Mateusz Maciej Węclewicz, Bartosz Malinowski, Jarosław Żak, Elżbieta Grześk, Grzegorz Grześk

Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w listopadzie 2017 r.

Streszczenie: Bakterie z rodzaju *Nocardia* spp. to Gram-dodatnie aeroby, występujące na całym świecie. Wywołują one nokardiozy, których najczęstszymi postaciami jest nokardioza płucna, rozwijająca się wskutek aspiracji drobnoustrojów do dróg oddechowych, skórna, w tym stopa madurska – mycetoma oraz rozsiana, w której zajęte mogą być inne narządy – często OUN. Infekcje dotyczą zwykle osób o obniżonej odporności np. zarażone wirusem HIV lub poddane immunosupresji. Za większość zakażeń u ludzi odpowiedzialna jest *Nocardia asteroides*. Do metod diagnostycznych zalicza się m.in. posiew z pobranego materiału lub PCR. Objawy są różne w zależności od postaci choroby. W nokardiozie płucnej występuje kaszel, krwioplucie a w skórnej ropnie. Gdy dochodzi do rozsiania choroby, w zależności od zajętego narządu występują różne symptomy. Lekiem stosowanym z wyboru jest sulfonamid.

1. Wstęp. 2. Historia. 3. Charakterystyka *Nocardia* spp. 4. Systematyka. 5. Chorobotwórczość. 6. Diagnostyka. 7. Leczenie. 8. Podsumowanie

***Nocardia* spp. – characteristics, pathogenicity, treatment**

Abstract: *Nocardia* spp. bacteria are Gram-positive aerobes occurring worldwide. They cause nocardiosis, of which the most common forms are pulmonary nocardiosis and cutaneous nocardiosis. The pulmonary form progresses as a result of aspiration of pathogens into the respiratory tract, whereas the cutaneous nocardiosis, can spread to other organs (often to CNS) and includes Madura foot, both mycetoma and systemic. Infections usually affect people with immunodeficiency, for example infected with HIV or after immunosupression therapy. *Nocardia asteroides* is responsible for the majority of infections in humans. Diagnostic methods include cell culture and PCR. The symptoms vary depending on the form of the illness. Cough and hemoptysis are characteristic for pulmonary nocardiosis, while abscesses are typical for the cutaneous form. When the illness spreads, the symptoms vary depending on the organ. The treatment of choice is sulfonamide.

1. Introduction. 2. History. 3. Characteristics of *Nocardia* spp. 4. Systematics. 5. Pathogenicity. 6. Diagnostics. 7. Treatment. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Nocardia* spp., nokardioza, stopa madurska
Key words: *Nocardia* spp., nocardiosis, Madura foot

1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Nocardia* są Gram-dodatnimi, występującymi na całym świecie, tlenowymi drobnoustrojami. Wywołują one nokardiozy – choroby ludzi oraz zwierząt, takich jak psy, bydło, ryby. Zakażenie najczęściej dotyczy płuc lub skóry, ale może zajmować każdy narząd – wówczas mówimy o rozsianej lub uogólnionej postaci choroby. Osoby z dysfunkcją układu immunologicznego, np. z wirusem HIV lub z chorobami układu oddechowego, są szczególnie narażone na infekcje tymi bakteriami. Źródłem infekcji są najczęściej inhalacje patogenu drogą wziewną lub poprzez zakażenia rany. Dane epidemiologiczne wskazują na podobne ryzyko zachorowania w każdej grupie wiekowej, chociaż w populacji męskiej zakażenia występują znacznie częściej. Bakterie te nie przenoszą się drogą transmisji człowiek–człowiek lub zwierzę–człowiek. Do gatunków odpowiadających za duży procent chorób możemy zaliczyć m.in. *Nocardia asteroides* oraz *Nocardia brasiliensis* [4, 18, 33].

2. Historia

W 1888 roku na Gwadelupie, francuski weterynarz Edmond Nocard, wyizolował tlenowy, nitkowaty drobnoustrój. Pochodził on z ropy oraz węzłów chłonnych bydła, które chorowało na nosaciznę. Nazwano go wówczas *Streptothrix farcinica*. Rok później, w 1889 roku Trevisan opisał ten mikroorganizm i nadał mu nazwę *Nocardia farcinica*. W 1890 roku Eppinger pobrał od pacjenta, cierpiącego na chorobę płuc przypominają gruźlicę, z ropniem w mózgu, podobny patogen i nadał mu nazwę *Cladotrix asteroides* [47]. Sześć lat po tym wydarzeniu, przemianowano go i dziś jest znany pod nazwą *N. asteroides*. Po raz pierwszy pozytywny efekt leczenia u człowieka choroby wywoływanej przez *Nocardia* spp. – nokardiozy, uzyskano w 1940 roku. Lekami, które okazały się wówczas skuteczne, w tej śmiertelnej dotąd chorobie, były chemioterapeutyki–sulfonamidy [4, 6, 18, 28].

* Autor korespondencyjny: Kamil Leis, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz; tel. 721 541 129; e-mail: kamil.leis@interia.pl

3. Charakterystyka *Nocardia* spp.

Nocardia spp. to promieniowce Gram-dodatnie, choć występują również formy, które nie ulegają barwieniu metodą Grama. Cechują się kwasoodpornością. Są katalazo-dodatnimi, mezofilnymi, obligatoryjnymi aerobami. Budują nitkowate, przypominające pręty, rozgałęzione struktury, które mogą wystawać ponad powierzchnię kolonii. Tworzą również strzępki powietrzne. Budową przypominają strzępki grzybów lub bakterie z rodzaju *Actinomyces* spp. Mogą one ulegać samoistnej fragmentacji [28]. Ich optimum termiczne to 30–37°C (są jednak gatunki o innym spektrum tolerancji termicznej, jak choćby *Nocardia acidivorans*, wzrastająca najlepiej przy 25–30°C lub *Nocardia amamiensis* – rozwijająca się w zakresie 15–37°C) [25, 58]. Niektóre szczepy wymagają odpowiedniego pH, np. optymalne pH dla *Nocardia alba* wynosi 7 a dla *Nocardia brevicatena* – 6,3. *Nocardia callitridis* natomiast posiada szeroki zakres tolerancji, mieszczący się w granicach 5,0–10,0. [20, 23, 31] Wzrost jest powolny, inkubacja trwa zazwyczaj ponad 48 godzin. Większość szczepów *Nocardia* spp. wytwarza pigment podobny do karotenoidów, co skutkuje różną barwą kolonii od żółtej, przez różowy i pomarańczowy, aż do czerwonej [4–6, 18, 26, 54].

Strukturę ściany komórkowej stanowi peptydoglikan chemotypu IV. W jego skład wchodzą takie związki jak; arabinoza, galaktoza, pochodzące z arabinogalaktanu, kwas mezodiaminopelinowy, kwas tuberkulostearynowy oraz kwasy mykolowe. Te ostatnie, znajdujące się w zewnętrznej części ściany komórkowej są połączone z peptydoglikanem poprzez arabinogalaktanowy polimer, zawierają od 44 do 64 atomów węgla w łańcuchu [4], czym odróżniają się od *Mycobacterium* spp., gdzie łańcuchy te są dłuższe. Większość szczepów Nocardia spp., podobnie jak *Mycobacterium* spp., *Rhodococcus* spp., *Arthrobacter* spp. i *Gordonia* spp. posiadają trehalozę [10]. Jest ona zazwyczaj połączona z kwasami mykolowymi w pozycji 6'6 i tworzy tzw. cord factor – czynnik wiązkowy, stanowiący adaptację do przeżycia wewnątrz komórek gospodarza – hamuje fuzję fagosomów w makrofagach. Nokardie są oporne na lizozym. Mają zdolność do rozkładania węglowodanów, węglowodorów, kwasów tłuszczowych oraz steroidów [4, 18]. Niektóre szczepy zawierają plazmidy [22, 27].

Rodzaje *Nocardia* oraz *Rhodococcus* okazały się być powiązane ze sobą, w oparciu o podobną budowę ACC (karboksylaza acetylo-CoA) oraz białka wiążącego ATP [16]. Wśród rodzaju występują szczepy o charakterze L form, czyli formy nieposiadające ściany komórkowej, co warunkuje oporność na wiele grup antybiotyków (hamujących biosyntezę ściany komórkowej), takich jak np. beta-laktamy czy glikopeptydy [4, 14]. Ma zdolność do tworzenia przetrwalników [7].

Bakterie należące do rodzaju *Nocardia N. asteroides*, *N. vaccinii* (jego szczepy zostały z czasem przeklasyfikowane do gatunków *N. elegant* oraz *N. pseudovaccinii*), *N. otitidiscavarium* oraz *N. carnea* mogą być są atakowane przez bakteriofagi, nazywane nokariofagami [1, 40, 53].

Patogeny te wydzielają substancje bioaktywne. Wśród nich możemy wyróżnić m.in.: nokardynę A, nokardynę B (wydzielane przez podgatunek *Nocardia uniformis tsuyamanensis*), nargencynę (wydzielaną przez *Nocardia argentiensis*), erytromycynę E, brasiinoid A oraz B, brasilikardynę A, B, C oraz D (produkowane przez *N. brasiliensis* oraz *Nocardia terpenica*, która wytwarza również brazylinolidy) [19], tubelaktomycynę A (wydzielaną przez *Nocardia vinacea*), nocobactin NA-a i NA-b (wytwarzane przez *N. farcinica*) czy odkryty dopiero w 2009 roku nocardithiocin, będące produktem *N. pseudobrasiliensis*. Z bakterii tych wyizolowano również związki antyoksydacyjne, związki wpływające na peroksydacje tłuszczów oraz działające na receptory muskarynowe M3 [35]. W związku z ciągłym wykrywaniem nowych gatunków *Nocardia* a także z rozwojem technik biologii molekularnej możemy przypuszczać, że kolejne bioaktywne substancje, mające zastosowanie w medycynie, będą ciągle odkrywane [2, 9, 35].

Nokardyna A, wykryta w 1976 roku, jest pierwszym naturalnie występującym betalaktamem monocyklicznym. Wykazuje aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, *Neisseria* spp. czy *Proteus* spp. W odróżnieniu od innych betalaktamów charakteryzuje się wysoką opornością na betalaktamazy. Substancja ta nie ma potwierdzonej żadnej oporności krzyżowej z innymi antybiotykami betalaktamowymi uważa się, że można ją stosować w celu eliminacji bakterii Gram-ujemnych [2, 35].

Nargencyna, będąca produktem *N. argentiensis*, wykazuje wzmożona aktywność wobec *Staphylococcus aureus* (MRSA). Substancja ta posiada również działanie przeciwzapalne, można ją również z wysoką skutecznością stosować przeciwko LPS [9, 35].

Tubelaktomycyna A zalicza się do grupy makrolidów. Została wyizolowana ze szczepu *Nocardia vinacea*, znanego wcześniej jako *Nocardia* sp. *MK703-102F1*. Antybiotyk ten testuje się obecnie pod kątem skuteczności w leczeniu gruźlicy [35].

Kolejnym, będącym obecnie w fazie testów związkiem bioaktywnym jest brasilikardyna. Uważa się, że wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, działając hamująco na biosyntezę aminokwasów oraz proliferację komórkową [35].

Ponadto poszczególne szczepy *Nocardia* spp. wykazują właściwości degradacji oraz biokonwersji. Przykładowo szczep *CL1 Nocardia globerula* rozkłada cykloheksanol a szczep *E1 N. farcinica* – gumę. Szczepy *Nocardia* spp. *SOB* oraz *N. cyriacigeorgica SBUG 1472*

są w stanie zdegradować ropę naftową. Biokonwersję wobec nitryli wykazuje szczep *108 Nocardia* spp. [35].

4. Systematyka

Systematyce *Nocardia* spp. towarzyszy wiele kontrowersji. Dzieje się tak z powodu ciągłego odkrywania nowych gatunków (dopiero w 2012 roku po raz pierwszy opisano przypadek izolacji z materiału pochodzącego od człowieka – z płuc chorego pacjenta – gatunku *Nocardia grenadensis* lub *Nocardia callitridis*, odkryta w 2010 roku) [13, 23] oraz problemami z zakwalifikowaniem odkrytych już gatunków. Dzięki metodzie PCR identyfikacja stała się szybsza i dużo bardziej miarodajna. Początkowo drobnoustroje te były zaklasyfikowane jako grzyby [4]. Obecnie wyróżnia się 87 gatunków, z czego uważa się że ponad 40 z nich ma wpływ na człowieka [5] (według innych badaczy liczba równa się 85, a te mające wpływ na człowieka to 25 [26] lub odpowiednio 80 i 33 [3]). Wszystkie gatunki zalicza się do: klasy *Actinobacteria* (promieniowce), podklasy *Actinetobacteridae*, rzędu *Actinomycetales*, podrzędu *Corynebacterineae* (dziś funkcjonującego pod nazwą *Corynebacteriales)* [46], rodziny *Nocardiceae*, rodzaju *Nocardia* [18]. Oprócz *Nocardia* spp. w rodzine *Nocardiae* znajdują się również rodzaje: *Gordonii* spp., *Millisia* spp., *Smaragdicoccus spp., Skermania* spp., *Rhodococcus* spp. i *Williamsia* spp. [35]

Gatunki dzielą się na patogenne oraz saprofityczne. Obok *Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp. i *Rhodococcus* spp. należą do tlenowych, Gram-dodatnich promieniowców [3, 4]. Wraz z rodzajami *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Tropheryma* spp. oraz *Mycobacterium* spp. zalicza się do patogenów *Actinobacteria* spp. [3].

Obok *Microbispora* spp., *Streptomyces* spp. i *Micromonospora* spp. należy do endofitów *Actinobacteria* spp. [3] Tworzy również grupę CMN, w skład której wchodzą *Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp. oraz *Nocardia* spp. [3].

Do najbardziej znanych gatunków możemy zaliczyć: *N. asteroides* (odpowiadająca za około połowę nokardioz u człowieka) [26], *Nocardia cyriacigeorgica*, *N. brasiliensis* (również patogen człowieka odpowiadający za duży procent zakażeń, dotyczy najczęściej zakażeń skórnych u osób z prawidłową odpowiedzią immunologiczną), *Nocardia nova*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia transvalensis*, *Nocardia africana*, *Nocardia kruczakiae*, *Nocardia veterana*, *Nocardia otidiscaviarum*. Wiele z nich tworzy kompleksy, np. *N. asteroides* jest kompleksem *N. asteroides*, *N. nova* i *N. farcinica* – przypisuje mu się około 80% wszystkich zakażeń [5, 6, 26].

Mimo, iż rodzaj *Nocardia* spp. występuje powszechnie na całym świecie (szczepy np. *N. asteroides* [4] czy *N. kruczakiae*) [12], niektóre gatunki obecne są jedynie na danym, wąskim obszarze. W tabeli I podano przykłady endemicznego występowania wybranych gatunków.

Tabela I
Endemicznie występujące gatunki *Nocardia* spp.

Gatunek	Miejsce występowania
Nocardia gamkensis	Republika Południowej Afryki
Nocardia harenae	Republika Korei
Nocardia flavorosea	Chiny
Nocardia inohanensis	Meksyk
Nocardia jejuensis	Wyspa Jeju, Republika Korei
Nocardia coubleae	Kuwejt
Nocardia lijiangensis	Południowe Chiny
Nocardia polyresitens	Południowo-zachodnie Chiny
Nocardia takedensis	Japonia
Nocardia terpenica	Japonia
Nocardia pigrifrangens	Chiny

Na podstawie [11, 19, 24, 30, 32, 34, 42, 45, 49, 55, 56, 57].

Innym, wartym uwagi gatunkiem jest *Nocardia goodfellowii*. Drobnoustrój ten został wyizolowany z gleby i opisany dopiero w 2012 roku. Wzrasta on w zakresie pH 5,0–10,0 i temperaturze 10–37°C. Mikroorganizm ten tworzący w hodowli białe lub żółtobrązowe kolonie, zawdzięcza swoją nazwę brytyjskiemu profesorowi Michaelowi Goodfellowi, który wniósł ogromny wkład w aktualną wiedzę oraz systematykę bakterii *Nocardia* spp. [44].

5. Chorobotwórczość

Nokardie są drobnoustrojami pospolicie występującymi w glebie (np. *Nocardia zapadnayensis* lub *N. amamiensis*) [38, 58], wodzie oraz na roślinach na całym świecie. Te saprofityczne bakterie mogą również występować w powietrzu oraz kurzu.

Bakterie z rodzaju *Nocardia* spp. wywołują tzw. nokardiozy, które możemy podzielić na nokardiozy płucne, skórne oraz uogólnione. Zakażenia te są zazwyczaj dotyczą osób o obniżonej odporności, choć chorują również te bez zaburzeń immunologicznych. Do grupy podwyższonego ryzyka należą: chorzy z HIV, AIDS, nowotworami układu limfatycznego (białaczki, chłoniaki), HCMV (ze względu na jego działanie immunosupresyjne) [51], przeszczepionymi narządami lub szpikiem kostnym (allogeniczne przeszczepy są zwykle obarczone większym ryzykiem niż autologiczne), proteinozą płuc, POCHP (w latach 1999–2012 roku przeprowadzono badanie, w którym spośród 6545 pacjentów u 4 zdiagnozowano nokardiozę płuc, z czego 3 z nich chorowało na POCHP, co może być potwierdzeniem związku między POCHP a nokardiozą) [36], osoby

poddawane immunosupresji w tym terapii kortykosteroidami, diabetycy, alkoholicy oraz osoby przyjmujące dożylnie narkotyki.

W 2014 roku opublikowano wyniki 11-letnich badań Wanga i wsp. Badacze analizie poddali pacjentów z rakiem, u których wtórnie dochodziło do infekcji nokardiami. Od 132 chorych na nowotwór nabłonkowy wyizolowano 138 szczepów. U 4 pacjentów doszło do dwóch zakażeń, co dało w sumie łączną liczbę 136 zakażeń, co wykazuje silną korelację między rakiem, czyli stanem obniżonej odporności a występowaniem nokardiozy. W badaniach mikrobiologicznych potwierdzono obecność szczepów *N. nova* (blisko 20%) *N. cyriacigeorgica* (18%) oraz *N. farcinica* (blisko 14%). Najczęstszą lokalizacją był układ oddechowy, zajęty w ponad 73% przypadków nokardioz. Pacjenci, u których doszło do dwóch zakażeń, chorowali na nowotwór hematologiczny i otrzymywali kortykosteroidy, co świadczy o korelacji stosowania tych leków z zakażeniem [48].

Zachorowania mogą też mieć związek z zakażeniami szpitalnymi (podwyższone ryzyko po przebytej operacji i u pacjentów cewnikowanych) [4, 6, 18, 26, 47, 54]. Stwierdzono, że w krajach rozwijających się, 60% zakażeń dotyczy osób immunoniekompetentnych [26]. Na nokardiozę zapadają pacjenci w każdym wieku, nawet noworodki, jednak najczęściej jest to przedział wiekowy 45–60 lat [18]. Szacuje się, że infekcje częściej dotykają mężczyzn niż kobiet (stosunek 3:1) [26]. W latach 2007–2011 w klinice Germans Trias i Pujol University Hospital w Barcelonie wykryto 12 przypadków nokardioz, z czego 75% dotyczyło mężczyzn [7]. Uważa się, że na nokardiozy co roku zapada co najmniej 500–1000 osób w samych Stanach Zjednoczonych a liczba ta z roku na rok wzrasta [47]. Infekcja bakteriami *Nocardia* spp. zwiększa ryzyko wystąpienia schizofrenii [50]. Zakażenie może też inicjować procesy neurodegeneracyjne [52].

Do infekcji dochodzi najczęściej poprzez aspirację patogenów z powietrza do dróg oddechowych. Innymi możliwościami są: rozprzestrzenienie się z jamy ustnej lub przewodu pokarmowego na skutek spożycia zakażonych pokarmów oraz poprzez kontaminację rany na skórze. Nie ma dowodów, żeby zakażenie przechodziło ze zwierząt na człowieka (zoonoza). Nie opisano również transmisji z człowieka na człowieka, jednak dane zawarte w piśmiennictwie wskazują na jej potencjalną możliwość [4, 18, 33].

Zjadliwość jest osobniczą cechą danego gatunku. Podstawowy mechanizm odpowiadający za chorobotwórczość, to wspomniany wcześniej, mechanizm hamowania fuzji fagosomów z lizosomami za pomocą cord factor i nieskuteczności fagocytozy. Bakterie z rodzaju *Nocardia* spp. wytwarzają SOD – dysmutazę ponadtlenkową oraz katalazę, które warunkują przetrwanie w organizmie gospodarza. Do kolejnych przystosowań można zaliczyć m. in. blokowanie zakwaszenia fagosomów. Niektóre szczepy wydzielają toksyny, jednak nie odgrywają one istotnej roli w patogenezie zakażenia [4].

Drogi oddechowe są główną drogą ekspozycji tych patogenów, więc zajęcie płuc jest najczęstszą manifestacją zakażenia. Do objawów zalicza się suchy lub mokry kaszel z odksztuszaniem gęstej, ropnej plwociny, ból w klatce piersiowej, duszność, krwioplucie, gorączkę, nocne poty, uczucie zmęczenia oraz utratę masy ciała. Przypominają one gruźlicę płuc. Czasami nokardie mogą być izolowane z miąższu płuc bez jakichkolwiek objawów ze strony zainfekowanego pacjenta [54]. Zajęcie płuc może być łagodne – występują rozproszone, drobne nacieki. W postaci ciężkiej obecne są duże, masywne, nieregularne guzki oraz wysięk w opłucnej. Zdarzają się przypadki powstawania martwiczego ropnia i włóknienia płuc [47].

W 2016 roku Kuchibiro i wsp. opisali pierwszy przypadek płucnej formy infekcji wywołanej przez *Nocardia mexicana*. Drobnoustrój wywołał stan immunosupresji u gospodarza. Badacze ci uważają ponadto, że patogen występuje na całym świecie, z wyjątkiem Meksyku, co sprawia, że nazwa może okazać się myląca [21].

Rzadszymi postaciami nokardioz dróg oddechowych są zapalenia tchawicy, oskrzeli, śródpiersia z zespołem żyły głównej górnej. Około połowa zachorowań rozszerza się poza płuca. Zakażenie z dróg oddechowych może szerzyć się z krwią do skóry – mówi się wówczas o wtórnej nokardiozie skórnej lub do innych narządów (nokardioza rozsiana) szczególnie do ośrodkowego układu nerwowego, powodując powstawanie w nim ropni. Zajęciu mózgu towarzyszy podwyższone ciśnienie wewnątrzczaszkowego, splątanie i zaburzenia świadomości, bóle głowy, nudności oraz wymioty. Rzadszą manifestacją zajęcia centralnego układu nerwowego jest zapalenie opon mózgowych [4–6, 26, 33, 47, 54]. Śmiertelność z powodu ropni mózgu, wywołanych infekcją *Nocardia* spp. wynosi 31% [3].

Kolejną, rzadszą formą zakażenia bakteriami *Nocardia* jest pierwotna nokardioza skórna. Powstaje zwykle wskutek wniknięcia patogenów przez uszkodzoną skórę. Może przybierać formy: zapalenia tkanki łącznej, mycetomy, zwanej stopą madurską, zakażeń limfatyczno-skórnych, zanokcicy oraz ropni. Występują zwykle u osób bez niedoborów odporności i nie rozsiewa się do narządów, w przeciwieństwie do nokardiozy płucnej. U dzieci zajęty obszar to zazwyczaj twarz a u dorosłych kończyny dolne. Głównym czynnikiem etiologicznym, odpowiedzialnym za większość zakażeń jest *N. brasiliensis* [4, 5, 6, 26, 47, 54]. Również inne gatunki, jak np. *Nocardia vulneris*, mogą być przyczyną postaci skórnej choroby. Lasker i wsp. w 2016 roku opisali przypadki izolacji tego drobnoustroju z ran. Izolaty uzyskano od mężczyzn w średnim wieku z miejsc skaleczeń na ramionach oraz na palcach [29].

Mycetoma to przewlekłe, powolnie postępujące zakażenie dochodzące do mięśni, powięzi a czasem nawet do kości, gdzie może wywołać zapalenie szpiku. Przebiega najczęściej w obrębie stóp, ale również ramion, pleców i głowy. Początkowo rozwija się guzek, który z czasem rośnie i może przekształcić się w ropień. Obecne są obrzęki. Pacjenci nie zgłaszają zazwyczaj dolegliwości bólowych. Stopę madurską wywołują również inne promieniowce oraz niektóre grzyby [4, 5, 6, 33, 54].

Mimo, że głównym czynnikiem choroby jest *N. brasiliensis*, opisano również przypadki mycetomy spowodowanej przez inne nokardie, np. *N. mexicana* – pierwsze doniesienia pochodzą z 2004 roku [41].

Zakażenie limfatyczno-skórne – kolejna odmiana pierwotnej nokardiozy skórnej, sięga węzłów chłonnych, które mogą być bolesne i powiększone. Występują guzki, ropnie, ziarniniaki, zaczerwienienie skóry, obrzęki oraz owrzodzenia. Forma ta jest podobna w przebiegu do sporotrychozy [4, 6, 15].

Jeśli zakażenie z dróg oddechowych przenosi się do innych narządów, mówimy o nokardiozie rozsianej. Stanowi ona najpoważniejszą postać zakażenia. Zainfekowane mogą być: wątroba, serce, osierdzie, nerki, oczy (zwłaszcza siatkówka), otrzewna, mózg, kości oraz stawy, a w rzadszych przypadkach również inne narządy. Obraz histopatologiczny charakteryzuje się obecnością owrzodzeń, ziarniniaków, guzków i martwiczych ropni w zajętych przez drobnoustroje miejscach [4, 6, 33].

Zakażenie oka może powstać po urazie oka, zabiegu chirurgicznym lub na skutek rozprzestrzeniania się z ogniska pierwotnego. W niektórych przypadkach występuje zapalenie naczyniówki, rogówki oraz tęczówki, ropnie i odwarstwienie siatkówki. Nieleczona nokardioza oczna wiąże się z całkowitą utratą wzroku w zakażonym przez patogeny oku [6].

Nokardie są również przyczyną infekcji dróg moczowych. Poisnel i wsp. opisali w 2015 roku przypadek mężczyzny z chorobą nerek oraz problemem z oddawaniem moczu. Diagnostyka mikrobiologiczna potwierdziła obecność *N. veterana*. Jest to pierwsza opisana sytuacja, gdzie patogen ten kolonizuje system urogenitalny człowieka. Wcześniej przypisywano mu etiologię m.in. ropnia mózgu oraz nokardiozy płucnej [39].

Zakażenia bakteriami z rodzaju *Nocardia* spp. dotyczą również zwierząt. Narażone są psy, bydło, koty (choć rzadziej niż u poprzednio wymienionych) owce, świnie, króliki, naczelne, ryby i konie. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za nokardiozę zwierząt jest *N. asteroides* – około 80%. Również infekcje *N. brasieliensis* oraz *N. otitidiscaviarum* stanowią duży odsetek zachorowań. Do zakażenia dochodzi, tak jak w przypadku ludzi przez środowisko: brudną wodę czy powietrze. Opisano jednak zakażenia krów poprzez skażony bakteriami sprzęt. U bydła może wywołać ronienia, nosaciznę i zapalenia gruczołu mlekowego. U psów na skutek infekcji dochodzi często do zapalenia szpiku. Podobnie, jak w przypadku ludzi, trzykrotnie częściej chorują samce. Na nokardiozę zapadają w ponad 60% osobniki przed ukończeniem 1. roku życia. Konie natomiast chorują bardzo rzadko, jednak najczęściej choroba kończy się śmiercią [17, 28]. Doniesiono także o przypadku, w którym u wołu wystąpiło rozrostowe zapalenie ścięgna oraz stawów. Czynnikiem odpowiedzialnym za powyższą przypadłość była *N. mexicana* [37].

Odnotowano występowanie niektórych gatunków nokardii jedynie u zwierząt. Przykładem tego może być *Nocardia salmonicida*, izolowana z ciała *Oncorhychus nerka* [43].

6. Diagnostyka

Kiedy podejrzewamy nokardiozę, diagnostyka polega na kilkukrotnym pobraniu plwociny. Ewentualnie materiał do badań może stanowić: popłuczyny oskrzelowe, płyn mózgowo-rdzeniowy, krew, materiał z drenażu ran, ropni, zainfekowanych tkanek. Strzępki nokardii, obecne w zakażonych tkankach są bardzo podobne do bakterii *Actinomyces* spp. W przeciwieństwie do nich są słabo kwasooporne [4].

Pobraną próbkę powinno ocenić się makroskopowo, czy obecne są „granulki". Następnie, w razie obecności tych struktur, materiał powinien być przemyty solą fizjologiczną i zbadany mikroskopowo. W celu wybawienia preparatu stosuje się zmodyfikowaną metodę Kinyoun lub metodę Ziehla-Neelsena. Uważa się, że metoda silver stain jest tak samo miarodajna, jak powyższa metoda. Stosuje się również barwienie metodą Grama, charakteryzująca się największą czułością. Testy te powinny być przeprowadzane razem z dodatkowym panelem badań diagnostycznych [6, 47].

Innym sposobem diagnostycznym, zarazem podstawowym i obowiązkowym w diagnozowaniu zakażeń bakteriami *Nocardia* spp., jest hodowla mikrobiologiczna. Do tego celu używa się podłóż nieselektywnych oraz podłoża Sabouarda, Loewensteina-Jensena, Tayera-Martina, agaru żelatynowego, parafinowego, z krwią oraz agaru BCYE. Bakterie na pożywce wzrastają powoli. Kolonie wymagają minimum 48–72 h aż staną się widoczne. Niekiedy zajmuje to więcej czasu – nawet do 14 dni. W związku z tym hodowle powinny być przechowywane przez co najmniej dwa tygodnie. Bakterie na pożywce tworzą charakterystyczne formy, opisane powyżej [6, 18, 47].

Identyfikacja na poziomie gatunku może być problematyczna, jednak jest ważnym elementem, z racji różnorodności stopnia zjadliwości poszczególnych szczepów gatunków. Pomocne mogą być testy biochemiczne na hydrolizę kazeiny, tyrozyny, ksantyny, hipoksantyny i żelatyny. Testy te charakteryzują się

niską czułością i rażliwością, ponieważ dużo gatunków *Nocardia* jest niereaktywnych i stale są odkrywane i opisywane nowe gatunki [6, 47].

Niektóre gatunki *Nocardia* wykazują stosunkową łatwość w identyfikacji. *N. farcinica* cechuje szybki wzrost (do 72 h) w temperaturze 45°C, tworzenie kwasu z L-ramnozy oraz wykorzystanie acetamidu jako źródła węgla i azotu. Niektóre szczepy *N. asteroides* również wykorzystują acetamid, produkują kwas z L-ramnozy i rosną w powyższej temperaturze, jednak procesy te są znacznie wolniejsze. Różnią się także wyglądem kolonii. *N. nova* wykazuje ujemne reakcje na produkcję kwasu oraz wykorzystywanie acetamidu. Dodatnia jest za to próba na aktywność arylosulfatazy, która daje ujemny wynik w dwóch poprzednio opisanych gatunkach [6, 47].

Inną metodą diagnostyczną są testy chemotaksonomiczne. Polegają one na badaniu obecności w komórkach kwasów mezodiaminopelinowych oraz specyficznych węglowodanów. Do tego rodzaju diagnostyki zalicza się również HPLC – wysokosprawną chromatografię cieczową. Ocenia się nią estry bromofenacylu kwasów mykolowych nokardii. Służy ona do oceny na poziomie gatunku ale w wielu przypadkach jest nieskuteczna. Używa się również chromatografii gazowo-cieczowej. Podczas tego procesu wydzielają się związki z pirolizy kwasów mykolowych, zawierające od 12 do 18 atomów węgla [6, 47].

W celu diagnostyki bakterii *Nocardia* spp. stosuje się również metody serologiczne. Do niedawna nie były stosowane do identyfikacji aktywnych nokardioz. Obecnie wykorzystuje się je jako źródło antygenów homogenaty szczepów *N. brasiliensis* lub *N. asteroides*. Testów immunodyfuzyjne okazały się na tyle niespecyficzne oraz niedające miarodajnych wyników u pacjentów immunoniekompetentnych, toteż nie ma przesłanek do prowadzenia diagnostyki nokardiozy z ich wykorzystaniem. Również niespecyficzny okazał się odczyn wiązania dopełniacza. Metoda ta okazała się jednak skuteczna w diagnostyce osób z obniżoną odpornością. Wszystkie testy serologiczne mają ograniczenia, wynikające z problemu diagnostyki u osób z niedoborami immunologicznymi oraz przez odkrywanie nowych szczepów i nieopisanie wielu pod kątem serologicznym [6, 47].

Opisane zostały również testy wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe. Analizie poddano tylko niewielką liczbę szczepów, więc nie używa się ich powszechnie [6].

Najlepszymi metodami okazały się być techniki biologii molekularnej. Charakteryzują się one większą szybkością i precyzyjnością niż inne. Należą do nich: PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy 16 S rRNA (w 1999 opisano jak rozróżnić izolaty nokardii od izolatów innych promieniowców), RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, techniki PRA, sekwencjonowanie DNA (okazała się być szybka oraz niezawodna metoda w diagnostyce większości szczepów *Nocardia*), pyrosekwencjonowanie oraz rybotypowanie [6, 47].

7. Leczenie

Lekami pierwszego wyboru w przeszłości były sulfonamidy. Obecnie dostosowuje się leczenie do indywidualnego profilu chorego. Wykonuje się posiew i ocenę wrażliwości na antybiotyki. Obecnie lekiem I rzutu nadal jest sulfonamid np. sulfametoksazol, połączony z trimetoprimem (3–6 g na dzień). U osób przyjmujących dożylnie narkotyki, zainfekowanych wirusem HIV, często występują skutki uboczne farmakoterapii jak np. gorączka czy wysypka. Wykazano też związek pomiędzy stosowaniem sulfonamidów a uszkodzeniem wątroby i niewydolnością nerek. Stosuję się też imipenem, kotrimoksazol, amikacynę czy linezolid (600 mg dwa razy dziennie, doustnie). W przypadku zajęcia ośrodkowego układu nerwowego zaleca się kotrimoksazol i ceftriakson. U pacjentów z ciężkim przebiegiem nokardiozy kojarzy się linezolid. Nie ma jednak jednego algorytmu, czy procedury leczenia z powodu odkrywania coraz to nowych patogennych szczepów *Nocardia*, nabywania oporności przez te bakterie oraz tego, że zakażenia *Nocardia* spp. występują często przy obniżonej odporności lub przy innej jednostce chorobowej takiej jak np. wirus HIV czy przewlekła obturacyjna choroba płuc, co wymaga uwzględnienia w prowadzonej terapii. Opisane wcześniej L-formy są oporne na wszystkie antybiotyki, których punktem uchwytu są enzymy, odpowiedzialne za biosyntezę ściany komórkowej. Ponadto większość szczepów wykazuje oporność na wankomycynę, erytromycynę, klindamycynę oraz z powodu produkcji B-laktamaz – penicylinę, niektóre cefalosporyny a około 44% na ampicylinę. Leczenie powinno trwać od 6 do 12 miesięcy, a w przypadku zajęcia centralnego układu nerwowego co najmniej 12 miesięcy [5, 18, 54]. W tabeli II przedstawiono wrażliwość niektórych szczepów *Nocardia* spp. na wybrane antybiotyki.

Tabela II
Wrażliwość wybranych gatunków *Nocardia* spp. na antybiotyki

Antybiotyk /Gatunek	Sulfa-metoksazol	Ceftriakson	Linezolid	Amikacyna	Imipenem
N. asteroides	W	W	W	W	W
N. brasiliensis	W	B	W	B	N
N. nova	W	W	W	W	W
N. farcinica	W/N	N	W	W	W

W – wrażliwy na dany antybiotyk, N – niewrażliwy na dany antybiotyk, W/N – gatunek może być wrażliwy lub nie, B – brak danych.
Na podstawie [54].

Obecnie nie ma żadnych szczepionek przeciwko bakteriom z rodzaju *Nocardia* spp. Z powodu ich powszechnego występowania jedynymi metodami profilaktyki jest leczenie choroby podstawowej oraz osłanianie ran u osób z podwyższonym ryzykiem infekcji [8].

8. Podsumowanie

Na dzień dzisiejszy rodzaj *Nocardia* spp. nie został do końca poznany. Dzięki takim metodom jak PCR możliwa jest jednak szybka i skuteczna identyfikacja i diagnostyka. Liczba zachorowań co roku wzrasta. Objawy nokardiozy, szczególnie płucnej nie są specyficzne – należą do nich duszność, kaszel, ból w klatce piersiowej, więc można łatwo postawić mylną diagnozę. Ze względu na powszechne występowanie nie są dostępne szczepionki ani możliwość uniknięcia ekspozycji. Szybko wprowadzona antybiotykoterapia, o ile nie doszło do rozsianej postaci zakażenia, zapewnia dobre wyniki u chorych.

Piśmiennictwo

1. Andrejzewski J., Müller G., Röhrscheidt E., Pielkiewicz D.: Isolation, characterization and classification of a *Nocardia asteroides* bacteriophage, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I*, **6**, 319–326 (1978)
2. Aoki H., Sakai H.I., Kohsaka M., Konomi T., Hosoda J.: Nocardicin a, a new monocyclic. BETA.-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **29**, 492–500 (1976)
3. Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel G.P.: Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **80**, 1–43 (2016)
4. Beaman B.L., Beaman L.: *Nocardia* Species: Host-Parasite Relationships, *Clin. Microbiol. Rev*. **7**, 213–264 (1994)
5. Bell M., McNeil M.M., Brown J.M.: *Nocardia* species (Nocardiosis). antimicrobe.org (01.02.2017)
6. Brown-Elliott B.A., Brown J.M., Conville P.S., Wallace Jr R.J.: Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy, *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 259–282 (2006)
7. Bruguera-Àvila N., Becker C., Garcia-Olivé I., Ruiz-Manzano J.: Pulmonary *Nocardia*: A single-center experience, *J. Pulm. Respir. Med.* **4** (2014)
8. Centers for Disease Control and Prevention: Cdc.gov/nocardiosis (01.02.2017)
9. Celmer W.D., Chmurny G.N., Moppett C.E., Ware R.S., Watts P.T., Whipple E.B.: Structure of natural antibiotic CP-47, 444. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4203–4209 (1980)
10. Christova N., Lang S., Wray V., Kaloyanov K., Konstantinov S., Stoineva I.: Production, Structural Elucidation, and *In Vitro* Antitumor Activity of Trehalose Lipid Biosurfactant from *Nocardia farcinica* Strain, *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 439–447 (2015)
11. Chun J., Seong C.N., Bae K.S., Lee K.J., Kang S.O., Goodfellow M., Hah Y.C.: Nocardia flavorosea sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 901–905 (1998)
12. Conville P.S., Brown J. M., Steigerwalt A.G., Lee J.W., Anderson V.L., Fishbain J.T., Holland S.M., F.G. Witebsky F.G.: Nocardia kruczakiae sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the "N. nova complex". *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5139–5145 (2004)
13. Ercibengoa M., Bell M., Vincente D., Marimón J.M.: First isolation of *Nocardia granadensis*, from a clinical sample. *JMM Case Reports*, 1–3 (2016)
14. Errington J.: L-form bacteria, cell walls and the origins of life. *Open Biol*. **3**, 1–7 (2013)
15. Fukuda H., Saotome A., Usami N., Urushibata O., Mukai H.: Lymphocutaneous type of nocardiosis caused by *Nocardia brasiliensis*: A case report and review of primary cutaneous nocardiosis caused by *N. brasiliensis* reported in Japan. *J. Dermatol.* **35**, 346–353 (2008)
16. Gao B., Gupta R.S: Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 66–112 (2012)
17. Gliński Z., Kostro K.: Zagrożenie zoonozami od zwierząt towarzyszących. Część I. Wścieklizna, choroba ptasia, erlichioza, leptospiroza, kampylobakterioza, salmoneloza i listerioza. *Życie Wet*. **88**, 835–841 (2013)
18. Hidri N., Farina C., Szponar B., Paściak M., Grzegorzewicz A., Mordarska H., Gamian A., Boiron P.: Nocardia i Nokardiozy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **69**, 677–686 (2001)
19. Hoshino Y., Watanabe K., Iida S., Suzuki S., Kudo T., Kogure T., Yazawa K., Ishikawa J., Kroppenstedt R.M., Mikami Y.: Nocardia terpenica sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **57**, 1456–1460 (2007)
20. Hoshino Y., Watanabe K., Iida S., Suzuki S., Kudo T., Kogure T., Yazawa K., Ishikawa J., Kroppenstedt R.M., Mikami Y.: 2007. *Nocardia terpenica* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1456–1460 (2007)
21. Ikeda T., Nakanishi H., Morishita Y., Houdai K., Ito J., Gonoi T.: (2016). First case report of pulmonary nocardiosis caused by Nocardia mexicana. *JMM Case Reports*, **3**, DOI 10.1099/jmmcr.0.005054 (2016)
22. Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Yoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T., Hattori M.: The complete genome sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14925–14930 (2004)
23. Kaewkla O., Franco C.M.M.: Nocardia callitridis sp. nov., an endophyte isolated from surface sterilized roots of an Australian native pine tree. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1532–1536 (2010)
24. Kageyama A., Yazawa K., Nishimura K., Mikami Y.: Nocardia inohanensis sp. nov., Nocardia yamanashiensis sp. nov. and Nocardia niigatensis sp. nov., isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 563–569 (2004)
25. Kämpfer P., Huber B., Buczolits S., Thummes K., Grün-Wollny I., Busse H.J.: *Nocardia acidivorans* sp. nov., isolated from soil of the island of Stromboli. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **57**, 1183–1187 (2007)
26. Kandi V.: Human *Nocardia* Infections: A Review of Pulmonary Nocardiosis, *Cureus*, 7, e304 (2015)
27. Kasweck K.L., Little M.L.: Genetic recombination in *Nocardia asteroids. J. Bacteriol.* **149,** 403–406 (1982)
28. Kita J., Maciołek H.: Nokardioza zwierząt. *Medycyna Wet.* **52**, 73–77 (1996)
29. Lasker B.A., Bell M., Klenk H.P., Spröer C., Schumann P., Brown J.M.: Nocardia vulneris sp. nov., isolated from wounds of human patients in North America. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **106**, 543–553 (2014)
30. Le Roes M., Meyers P.R.: Nocardia gamkensis sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, **90**, 291–298 (2006)

31. Lechevalier H.A., Solotorovsky M., McDurmont C.I.: A new genus of the *Actinomycetales*: *Micropolyspora* gen. nov. *J. Gen. Microbiol.* **26**, 11–18 (1961)
32. Lee S.D.: Nocardia jejuensis sp. nov., a novel actinomycete isolated from a natural cave on Jeju Island, Republic of Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 559–562 (2006)
33. Lerner P.I.: Nocardiosis. *Clin. Infect. Dis.* 22, 891–905 (1996)
34. Liu Z., Ruan J.S., Yan X.C.: The new species of Nocardia. *Acta Microbiol. Sinica,* **23**, 298–304 (1983)
35. Luo Q., Hiessl S., Steinbüchel A.: Functional diversity of Nocardia in metabolism. *Environ. Microbiol.* **16**, 29–48 (2014)
36. Maggiorelli C., Di Pierro I., Manta C., Maccari U., Galanti I., Scala R.: *Nocardia* and Lungs in COPD: Beyond Immuno-deficiencies. *J. of Chron. Obst. Pulmon. Dis*. **12**, 321–326 (2015)
37. Owen H., Buckle K., Olm J., Leitner M., Pandey S., Gaughan J.B., Sullivan M.L., Lees A.M., Gibson J.S.: Isolation of Nocardia mexicana from focal proliferative tenosynovitis and arthritis in a steer. *Aust. Vet. J.* **93**, 170–173 (2015)
38. Ozdemir-Kocak F., Saygin H., Saricaoglu S., Cetin D., Pötter G., Spröer C., Guven K., Isik K., Klenk H., Sahin N.: Nocardia zapadnayensis sp. nov., isolated from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, **109**, 95–103 (2016)
39. Poisnel E., Roseau J.B., Landais C., Rodriguez-Nava V., Bussy E., Gaillard T.: Nocardia veterana: disseminated infection with urinary tract infection. *Braz. J. Infect. Dis.* **19**, 216–219 (2015)
40. Prauser H.: Host-phage relationships in nocardioform organisms. In The Biology of the Nocardiae (edited by Goodfellow, Brownell and Serrano). *Academic Press, New York*, 266–284 (1976)
41. Rodríguez-Nava V., Couble A., Molinard C., Sandoval H., Boiron P., Laurent F.: Nocardia mexicana sp. nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4530–4535 (2004)
42. Rodriguez-Nava V., Khan Z.U., Pötter G., Kroppenstedt R.M., Boiron P., Laurent F.: Nocardia coubleae sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1482–1486 (2007)
43. Rucker R.R.: A streptomycete pathogenic to fish. *J. Bacteriol.* **58**, 659–664 (1949)
44. Sazak A., Sahin N., Camas M.: Nocardia goodfellowii sp. nov. and Nocardia thraciensis sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 1228–1234 (2012)
45. Seo J.P., Lee S.D.: Nocardia harenae sp. nov., an actinomycete isolated from beach sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2203–2207 (2006)
46. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L.: Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 479–491 (1997)
47. Vohra P., Sharma M., Yadav A., Chaudhary U.: Nocardiosis: A review of clinicomicrobiological features. *Int. J. Life Sc. Bt & Pharm. Res*. 2, 20–29 (2013)
48. Wang H.L., Seo Y.H., LaSala P.R., Tarrand J.J., Han X.Y.: Nocardiosis in 132 Patients With Cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* **142**, 513–523 (2014)
49. Wang L., Zhang Y., Huang Y., Maldonado L.A., Liu Z., Goodfellow M.: Nocardia pigrifrangens sp. nov., a novel actinomycete isolated from a contaminated agar plate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1683–1686 (2004)
50. Wiciński M., Malinowski B., Grześk E., Szadujkis-Szadurska K., Czeczuk A., Michalska A., Klonowska J., Wójtowicz-Chomicz K., Ostrowska J., Stolarek W., Grześk G.: Czynniki biologiczne w etiopatogenezie schizofrenii. *Post. Mikrobiol.* **53**, 328–334 (2014)
51. Wiciński M., Sopońska P. Brzoszczyk B., Malinowski B., Michalska A., Grześk E., Szadujkis-Szadurska K., Kornatowski T., Czeczuk A., Grześk G.: Udział ludzkiego cytomegalowirusa w mechanizmach karcynogenezy glejaka wielopostaciowego. *Post. Mikrobiol.* **52**, 355–361 (2013)
52. Wiciński M., Sopońska P., Brzoszczyk B., Malinowski B., Grześk E., Michalska A.: Rola czynników zakaźnych w chorobach neurodegeneracyjnych. *Post. Mikrobiol.* **52**, 93–103 (2013)
53. Williams S.T., Wellington E.M.H., Tipler L.S.: The taxonomic implications of the reactions of representative Nocardia strains to actinophage. *J. Gen. Microbiol.* **119**, 173–178 (1980)
54. Wilson J.W.: Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. *Mayo Clin. Proc.* **87**, 403–407 (2012)
55. Xu P., Li W.J., Tang S.K., Jiang Y., Chen H.H., Xu L.H., Jiang C.L.: Nocardia polyresistens sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1465–1470 (2005)
56. Xu P., Li W.J., Tang S.K., Jiang Y., Gao H.Y., Xu L.H., Jiang C.L.: Nocardia lijiangensis sp. nov., a novel actinomycete strain isolated from soil in China. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 308–314 (2006)
57. Yamamura H., Hayakawa M., Nakagawa Y., Tamura T., Kohno T., Komatsu F., Iimura Y.: Nocardia takedensis sp. nov., isolated from moat sediment and scumming activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 433–436 (2005)
58. Yamamura H., Tamura T., Sakiyama Y., Harayama S.: *Nocardia amamiensis* sp. nov., isolated from a sugar-cane field in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1599–1602 (2007)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 77–82
http://www.pm.microbiology.pl

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

KONFERENCJA POD PATRONATEM PTM

Konferencja międzynarodowa:

NON-CONVENTIONAL YEASTS: FROM BASIC RESEARCH TO APPLICATION

Rzeszów 15–18 maja 2018 r.

Wszelkie informacje o konferencji znajdują się na stronie internetowej:
http://nonconventionalyeasts2018.pl/

Zachęcamy również do zapoznania się z broszurą informacyjną:
NCY Rzeszow 15–18 maja 2018

Kontakt:

Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Rolnictwa,
Uniwersytet Rzeszowski, ul. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów, tel: 667-147-782,
e-mail: non.conventional.yeasts2018@gmail.com

KONFERENCJA POD PATRONATEM PTM

III Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne

„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK"

Lublin, 28–29 czerwca 2018 r.

Celem Sympozjum jest podsumowanie dotychczasowych badań i przedstawienie najnowszych osiągnięć 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. 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. Przewiduje się organizację następujących sesji naukowych: nowoczesne metody identyfikacji mikroorganizmów, metagenomika środowisk ekstremalnych, metagenomika aplikacyjna, metagenomika a jakość środowiska.

Organizatorzy:

Instytut Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II
Instytut Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk w Lublinie,
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa,
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Kontakt:

dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ściseł,
Kierownik Zakładu Mikrobiologii Środowiskowej Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, tel.: (81) 537 59, 18/39/20,
e-mail: jolanta.jaroszuk-scisel@poczta.umcs.lublin.pl

Agnieszka Solińska
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła, Instytut Biotechnologii,
Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, ul. Konstantynów 1 i, 20-708 Lublin
tel.: (81) 45-45-460, e-mail: awolin@kul.pl

KONFERENCJA POD PATRONATEM PTM

V edycja konferencji

VIRUSES OF MICROBES V: BIODIVERSITY AND FUTURE APPLICATIONS

Wrocław, 9–13 lipca 2018 r.

Jest to piąte już spotkanie z serii międzynarodowych konferencji towarzystwa International Society for Virus of Microbes (ISVM) poświęconej wirusom drobnoustrojów. Konferencje Virus of Microbes dobywają się co dwa lata, a rozpoczęły się w 2010 roku w Instytucie Ludwika Pasteura w Paryżu, a następnie kontynuowane były w Brukseli (2012), Zurichu (2014), i Liverpoolu (2016), gromadząc na każdym spotkaniu ok. 400–500 uczestników z całego świata.

Spotkanie zatytułowane jest „Biodiversity and future application". Tematyka pięciodniowej konferencji poświęcona będzie podstawowym i aplikacyjnym badaniom naukowym nad wirusami mikroorganizmów (algi, archaea, bakterie, grzyby, pierwotniaki i wirusy). Wirusy są kluczowym elementem warunkującym bioróżnorodność i ewolucję mikrobiologiczną, jak również służą jako narzędzie w biologii molekularnej. W ostatnich czasie coraz większym zainteresowaniem cieszą się badania nad bakteriofagami, które stanowią obiecująca alternatywę leczenia infekcji wywołanych zwłaszcza przez wielooporne szczepy patogenów człowieka, a są stosowane już w konserwacji żywności, hodowli zwierząt i produkcji roślin uprawnych.

Uniwersytet Wrocławski (prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa) wraz z Laboratorium Bakteriofagowym Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu (prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska), mają zaszczyt organizować kolejną międzynarodową edycję tej konferencji w 2018 roku.

Konferencja porusza tematykę niezwykle aktualną i będzie dedykowana do wszystkich osób zajmujących się zagadnieniami z zakresu zwalczania zakażeń bakteryjnych, jak również ekologii i różnorodności biologicznej drobnoustrojów.

Konferencja została objęta patronatem przez European Molecular Biology Organization jako EMBO Workshop „Viruses of microbes 2018" http://www.embo.org/events

Lokalizacja:
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii
ul. Uniwersytecka 22/26, 50-145 Wrocław

Organizatorzy:
Uniwersytet Wrocławski, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

Kontakt:
prof. Zuzanna Drulis-Kawa, zuzanna.drulis-kawa@uwr.edu,pl, tel. 71 375 62 90
prof. Krystyna Dąbrowska, dabrok@iitd.pan.wroc.pl, tel. 71 337 11 72 wewn. 316

INTERNATIONAL CONFERENCE

VIRUSES OF MICROBES V: BIODIVERSITY AND FUTURE APPLICATIONS

9–13 July 2018 Wrocław, Poland

Institute of Genetics and Microbiology University of Wrocław & Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy Polish Academy of Sciences On behalf of the organising committee of the ISVM conference on the Viruses of Microbes, we are pleased to invite to the fifth meeting in an international series that began in 2010 at the Pasteur Institute.

This event is one that focuses on basic and applied scientific research on viruses infecting microbes (algae, archaea, bacteria, fungi, protozoa and viruses). Viruses have always been a key element of microbial diversity and evolution, as well as a tool for the molecular biologist to learn more about how the host cell functions, but this information has also been put to productive use in latter days to control infections and fouling in many areas of our modern life.

The conference is included to the EMBO Workshop list http://www.embo.org/events

Location:
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii
ul. Uniwersytecka 22/26, 50-145 Wrocław

Organizers:
Uniwersytet Wrocławski; Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

Contact:
prof. Zuzanna Drulis-Kawa, zuzanna.drulis-kawa@uwr.edu,pl, tel. 71 375 62 90
prof. Krystyna Dąbrowska, dabrok@iitd.pan.wroc.pl, tel. 71 337 11 72/ 316

Organizatorzy wszystkich konferencji współorganizowanych przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów i obejmowanych patronatem PTM powinni zagwarantować zniżkowe opłaty rejestracyjne dla członków PTM

INFORMACJA O PRACY PREZYDIUM ZARZĄDU GŁÓWNEGO PTM

Warszawa, 02.01.2018 r.

Szanowni Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów,

Zaczął się Nowy Rok 2018. Życzymy Państwu sukcesów osobistych i zawodowych, rozwoju Oddziałów Terenowych PTM, a także poprawy kondycji całego naszego Stowarzyszenia.

Poniżej szereg informacji z ostatnich prac Prezydium ZG PTM

1. Materiały z Nadzwyczajnego Walnego Zgromadzenia Delegatów PTM, które odbywało się w ramach Konferencji Naukowej „PTM wczoraj – dziś – jutro", Kraków 22–23 września 2017 r., wraz z nowym statutem PTM zostały skompletowane, podpisane, przekazane do kancelarii prawnej i złożone do Krajowego Rejestru Sądowego. Oczekujemy na decyzję Sądu.

2. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów składa ogromne podziękowanie **Zgromadzeniu Fundatorów Założycieli Fundacji na Rzecz Polskiej Mikrobiologii**, w osobach:

prof. dr hab. Danuta Daniela Dzierżanowska-Madalińska
prof. dr hab. Jerzy Franciszek Hrebenda
prof. dr hab. Marek Aleksander Jagielski
prof. dr hab. Adam Jan Jaworski
prof. dr hab. Stanisław Mirosław Kałużewski
prof. dr hab. Józef Feliks Kubica
dr hab. Jan Andrzej Patzer
dr Bohdan Jerzy Starościak
dr Jolanta Elżbieta Szych

za podjętą po likwidacji Fundacji decyzję i przekazanie dnia 14 grudnia 2017 r. kwoty 27 527 zł na konto PTM na cele statutowe PTM związane z rozwojem polskiej mikrobiologii.

3. Tuż przed Świętami Bożego Narodzenia PTM otrzymało dofinansowanie Konferencji „90 lat PTM" z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, z puli przeznaczonej na działalność upowszechniającą naukę. Dotacja ta umożliwi pokrycie kosztów konferencji. W trybie bardzo pilnym musieliśmy sporządzić sprawozdania merytoryczne i finansowe, aby rozliczyć otrzymane dofinansowanie. Dnia 12.01.br. przekazano materiał do MNiSW i obecnie czekamy na decyzję.

4. Złożono wniosek do MNiSW na działalność upowszechniającą naukę – o dofinansowanie modernizacji w latach 2018–2019 czasopism PTM: *Polish Journal of Microbiology* i *Postępów Mikrobiologii*.

5. Objęto patronatem PTM Międzynarodowe Sympozjum Naukowe „Non-conventional Yeasts: from basic aspects to applications" organizowane przez Uniwersytet Rzeszowski, zaplanowane w dniach 15–18 maja 2018 r. w Rzeszowie (Uchwała nr 42-2017 z dnia 15.11.2017 r.), a także III Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „Metagenomy różnych środowisk" zaplanowane w dniach 28–29 czerwca 2018 r. w Lublinie (Uchwała nr 5-2018 z dnia 15.01.2018 r.). Konferencje: „**Viruses of Microbes V: Biodiversity and future applications" i „Non-conventional Yeasts: from basic aspects to applications",** dzięki poparciu PTM, w tym finansowemu, uzyskały dofinansowanie z FEMS w kwocie 5,000 Euro, każda.

6. Przypominamy, że członkowie PTM począwszy od stycznia 2018 r. nie będą otrzymywać bezpłatnych zeszytów kwartalników *Postępy Mikrobiologii* i *Polish Journal of Microbiology.* Czasopisma te są dostępne w wersji elektronicznej. Zgodnie z uchwałami 29-2017 i 30-2017 ZG PTM członkowie PTM mają dostęp do wszystkich, w tym bieżących numerów, kwartalników *Postępy Mikrobiologii* oraz *Polish Journal of Microbiology* w 2018 r., po zarejestrowaniu się w systemie na stronie internetowej PTM. Jednocześnie informujemy, że osoby, które będą chciały posiadać wersje papierowe tych czasopism w roku 2018 muszą zamówić i wykupić prenumeratę *Postępów Mikrobiologii* oraz *Polish Journal of Microbiology* bezpośrednio w Zakładzie Wydawniczym Letter Quality, e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com.

Cena jednego zeszytu kwartalników w 2018 r. będzie wynosiła 40 zł + 5% VAT, tym samym roczna prenumerata (w 2018 r.) każdego z czasopism będzie wynosiła 160 zł + 5% VAT (Uchwała nr 10-2018 z dnia 15.01.2018 r.). Wysokość ceny jest taka sama dla wszystkich chętnych prenumeratorów. Nowa cena jeszcze w pełni nie rekompensuje kosztów wydania zeszytu, lecz zmniejsza straty wydawnicze PTM.

7. Uruchomiono system logowania się na stronie PTM przez członków PTM z opłaconymi składkami członkowskimi za 2017 r. i lata wcześniejsze. Uaktualniane są przy okazji dane osobowe członków i ich adresy. Rozważamy różne warianty informacji, które mogłyby być dostępne dla członków PTM po zalogowaniu się na stronę. Na dzień 31.01.2018 r. 200 członków już się zalogowało.

8. Przypominamy, że dla manuskryptów otrzymywanych przez redakcję Polish Journal of Microbiology od 01.07.2018 r. zostaną podniesione opłaty redakcyjne

za publikację w PJM, odpowiednio:
dla autorów korespondencyjnych, członków PTM z: 125 USD + 23% VAT do 250 USD + 23% VAT
oraz dla pozostałych osób z 250 USD + 23% VAT do 500 USD + 23% VAT
(Uchwała nr 40-2017 z dnia 31.10.2017 r.).

9. W związku ze zgłoszoną przez Panią prof. Jolantą Solecką rezygnacją z funkcji Redaktora Naczelnego czasopisma *Polish Journal of Microbiology* oraz rezygnacją z funkcji sekretarzy Pani mgr Joanny Ziemskiej i Pana mgr Adama Guśpiela z NIZP-PZH, po rozeznaniu istniejącej sytuacji, postanowiono przychylić się do prośby Pani prof. Jolanty Soleckiej z zespołem i po skompletowaniu numeru 1/2018 PJM, z dniem 28.02.2018 r. powierzyć funkcję Redaktora Naczelnego PJM Pani prof. Elżbiecie Annie Trafny, członkowi Prezydium ZG PTM (Uchwala nr 2-2018 z dnia 15.01.2018 r.). Ponadto postanowiono zatrudnić nową osobę do prowadzenia spraw sekretarskich związanych z wydawaniem *Polish Journal of Microbiology.* W 2018 r. ulega także zmianie firma świadcząca usługi wydawania przez PTM czasopisma PJM drogą elektroniczną, została nią amerykańska firma Exeley (Uchwała nr 3-2018 r. z dnia 15.01.2018 r.).

10. W związku z pismem Pana prof. Waldemara Rastawickiego Redaktora Naczelnego kwartalnika Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia w sprawie współfinansowania przez PTM wydawania tego czasopisma, podjęto uchwałę (nr 11-2018 z dnia 15.01.2018 r.) w sprawie niefinansowania kwartalnika oraz rezygnacji z zapisu dotyczącego PTM w treści informacji „organ Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów" (pozostaje zapis dotyczący tylko NIZP-PZH). Wnioskowaliśmy, aby informacja „W latach 1949–2017 kwartalnik *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia* ukazywał się jako organ Państwowego Zakładu Higieny (obecnie Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny) w Warszawie oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów" wraz z logo PTM, zamieszczone zostały na wewnętrznej stronie okładki wszystkich zeszytów kwartalnika.

Do końca 2017 r. koszty związane z wydawaniem kwartalnika *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia* w całości pokrywał Państwowy Zakład Higieny, obecnie NIZP-PZH.

11. Toczą się rozmowy pomiędzy PTM, FEMS i Firmą Global Congress w sprawie organizacji FEMS Council w Warszawie w dniach 7–8. września 2018 r. w Warszawie.

12. W odpowiedzi na prośbę Ministerstwa Zdrowia, PTM zgłosiło kandydaturę Pani prof. Katarzyny Dzierżanowskiej-Fangrat, zastępcy dyrektora ds. klinicznych Instytutu-Pomnika Centrum Zdrowia Dziecka na Konsultanta Krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej.

13. Uchwałami nr 43-2017 z dnia 15.11.2017 r. oraz nr 6-2018 z dnia 15.01.2018 r. przyjęto 16 nowych członków zwyczajnych do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

14. Jeden członek naszego Towarzystwa otrzymał FEMS Travel Grant umożliwiający uczestnictwo w konferencji "Challenges and new concepts in antibiotics research" w dniach 19–21.03.2018 r. w Instytucie Pasteur'a w Paryżu.

15. Jesteśmy na kolejnym etapie porządkowania spraw opłat składek członkowskich PTM.

Tabele z informacjami o zaległych składkach członków Oddziałów Terenowych PTM przekazano do Przewodniczących Oddziałów.

Zgodnie z nowym statutem PTM, przyjętym na Nadzwyczajnym Walnym Zgromadzeniu Delegatów PTM w Krakowie w dniu 23.09.2017 (statut jest obecnie w trakcie rejestracji w sądzie) członkiem zwyczajnym PTM w 2018 r. może być osoba, która ma uregulowane wszystkie składki przed 2018 r. Osoby, które nie zapłaciły składki za 2015, 2016 lub 2017 rok są informowane o konieczności niezwłocznego uregulowania zaległych składek do końca stycznia 2018 r.

Na dzień 31.01.2018 r. jeszcze 243 osób (z ogólnej liczby 1005 członków PTM) nie uregulowało zaległych składek.

16. W Uchwale nr 9-2018 z dnia 15.01.2018 r. ustanowiono, zgodnie z par. 15 nowego statutu PTM z dnia 23.09.2017 r., dodatkowy miesięczny (do końca lutego) terminu do uregulowania opłat za zaległe składki członkowskie PTM za lata 2015–2017. W ciągu lutego zostanie wysłane kolejne przypomnienie o konieczności uregulowania wszystkich zaległości do dnia 01.03.2018 r. Jeżeli nie zostaną one uregulowane, na planowanym zebraniu Zarządu Głównego PTM w marcu br., zostanie podjęta uchwała o usunięciu osób z nieopłaconymi składkami za poprzednie lata (2015–2017) z grona członków PTM. Powinniśmy dążyć do sytuacji, gdy składki członkowskie są regularnie wpłacane na konto PTM. Jednocześnie przypominamy o obowiązku opłacenia składki członkowskiej za 2018 rok, zgodnie ze statutem, w pierwszym kwartale 2018 r.

Wysokość składki członkowskiej w 2018 r. nie uległa zmianie i nadal wynosi 100 zł.

17. Pani prof. Ewa Augustynowicz-Kopeć, wiceprezes PTM, opracowuje projekt regulaminu pracy Zarządu Głównego PTM, wymagany przez statut PTM. Projekt regulaminu będzie przedstawiony na marcowym zebraniu ZG PTM.

18. Ustalono, na tym samym poziomie, co w 2017 r., wynagrodzenia dla zespołów redakcyjnych Postępy Mikrobiologii (Uchwała nr 1-2018), Polish Journal of Microbiology (Uchwała nr 4-2018) oraz Pań księgowej PTM (Uchwała nr 7-2018) i sekretarki PTM (Uchwała nr 8-2018).

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

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

CZŁONEK WSPIERAJĄCY PTM – ZŁOTY

od 27.03.2017 r.

HCS Europe – Hygiene & Cleaning Solutions
ul. Warszawska 9a, 32-086 Węgrzce k. Krakowa
tel. (12) 414 00 60, 506 184 673, fax (12) 414 00 66
www.hcseurope.pl

Firma projektuje profesjonalne systemy utrzymania czystości i higieny dla klientów
o szczególnych wymaganiach higienicznych, m.in. kompleksowe systemy mycia, dezynfekcji,
osuszania rąk dla pracowników służby zdrowia,
preparaty do dezynfekcji powierzchni dla służby zdrowia, systemy sterylizacji narzędzi.

CZŁONEK WSPIERAJĄCY PTM – SREBRNY

od 07.06.2017 r.

Aesculap Chifa Sp. z o.o.
ul. Tysiąclecia 14
64-300 Nowy Tomyśl
tel. (61) 44 20 100, fax (61) 44 23 936
www.chifa.com.pl

Aesculap Chifa Sp. z o.o. jest członkiem grupy B. Braun,
jednej z wiodących na świecie firm medycznych,
produkującej i dystrybuującej między innymi preparaty do antyseptyki rąk, skóry, błon śluzowych,
do mycia i dezynfekcji wyrobów medycznych oraz powierzchni.

CZŁONEK WSPIERAJĄCY PTM – SREBRNY

od 12.09.2017 r.

Firma Ecolab Sp. z o.o. zapewnia:
najlepszą ochronę środowiska pracy przed patogenami powodującymi zakażenia
podczas leczenia pacjentów, bezpieczeństwo i wygodę personelu,
funkcjonalność posiadanego sprzętu i urządzeń.
Firma jest partnerem dla przemysłów farmaceutycznego, biotechnologicznego i kosmetycznego.

CZŁONEK WSPIERAJĄCY PTM – SREBRNY

od 12.12.2017 r.

WODOCIĄGI Krakowskie

1901

Od ponad 100 lat siedziba Wodociągów Krakowskich mieści się przy ul. Senatorskiej.
Budowę obiektu ukończono w 1913 roku.
W 2016 r. do sieci wodociągowej wtłoczono ponad 56 mln m^3 wody.
Szacuje się, że ponad 99,5% mieszkańców Gminy Miejskiej Kraków
posiada możliwość korzystania z istniejącej sieci wodociągowej.

CZŁONEK WSPIERAJĄCY PTM – ZWYCZAJNY

od 12.09.2017 r.

MERCK

Merck Sp. z o.o. jest częścią międzynarodowej grupy Merck KGaA z siedzibą w Darmstadt, Niemcy
i dostarcza na rynek polski od roku 1992 wysokiej jakości produkty farmaceutyczne
i chemiczne, w tym podłoża mikrobiologiczne

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Mikrobiologii zamieszczają artykuły przeglądowe ze wszystkich dziedzin mikrobiologii, które nie zostały wcześniej opublikowane w innych czasopismach. Drukujemy również prace przeglądowe metodyczne oraz w dziale Nowości Wydawnicze recenzje nowych książek z zakresu mikrobiologii i nauk pokrewnych, które ukazują się w Polsce. Artykuły i ilustracje drukowane w ***Postępach Mikrobiologii*** nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

1. Sposób przygotowania manuskryptu. 1.1. Tekst. 1.2. Ilustracje i tabele. 1.3. Piśmiennictwo. 1.4. Cytowanie danych z sieci internetowej. 2. Prawa autorskie. 3. Zalecenia szczegółowe. 3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów. 3.2. Nomenklatura genetyczna. 3.3. Skróty nazw chemicznych. 3.4. Pisownia danych numerycznych. 3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami. 4. Proces recenzowania. 5. Sposób przygotowania i nadesłania manuskryptu. 6. Uwagi dodatkowe

1. Sposób przygotowania manuskryptu

1.1. Tekst

Prace należy przysyłać do Redakcji w postaci elektronicznego zapisu tekstu w edytorze Microsoft Word dowolnej edycji w wersji PL jako załącznik poczty elektronicznej. Objętość pracy nie powinna przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 30 stron (wielkość czcionki 12, odstęp pomiędzy wierszami 1,5). Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Na oddzielnej stronie (strona tytułowa) należy podać tytuł pracy, pod nim w pełnym brzmieniu imiona i nazwiska autorów oraz afiliacje. Na dole strony należy podać imię i nazwisko autora korespondencyjnego, podać afiliację oraz dokładne dane adresowe i kontaktowe. Na stronie tytułowej należy również zamieścić spis treści (tytuły poszczególnych rozdziałów) oraz nie więcej niż 5 słów kluczowych (key words), podanych w porządku alfabetycznym. Tytuł pracy, spis treści i słowa kluczowe należy powtórzyć w języku angielskim.

W pliku ze stroną tytułową należy zamieścić krótkie streszczenie pracy w języku angielskim (maksymalnie 250 słów). Praca powinna kończyć się krótkim podsumowaniem, zawierającym najistotniejsze elementy treści. Tekst pracy powinien być zgodny z zaleceniami szczegółowymi Redakcji.

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przygotowane według wyżej wymienionych wytycznych oraz szczegółowych wytycznych przedstawionych w drugiej części instrukcji należy przesłać na adres Redaktora Działu. Przesłane do Redakcji prace winny być napisane poprawną polszczyzną. Redakcja rekomenduje P.T. Autorom Słownik Poprawnej Polszczyzny (Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa) jako pomoc w redagowaniu tekstu. Jakkolwiek *Postępy Mikrobiologii* są polskojęzyczne, nie wyklucza się druku prac napisanych w języku angielskim. Ze względu na powszechność języka angielskiego, Redakcja zrezygnowała z oznaczania języka (ang.) dla wyrażeń w tym języku.

1.2. Ilustracje i tabele

Tabele i ryciny powinny być dostarczone jako osobne pliki. Maksymalne rozmiary rycin i tabel planowanych w artykule w jednej szpalcie nie powinny przekraczać szerokości 82 mm, a zaplanowanych w obszarze dwóch szpalt – 169 mm. Dozwolona wysokość grafik wynosi 246,6 mm.

W manuskrypcie nie należy pozostawiać wolnych miejsc na tabele i ryciny (rysunki, wykresy i zdjęcia), a tylko w tekście zaznaczyć miejsce, w którym powinny być umieszczone, np.

– tab. I
– ryc. 1

Liczbę rycin i tabel należy ograniczyć do minimum. Tabele i ryciny powinny być umieszczone wraz z opisem w osobnym pliku. Tabele oznaczamy kolejnymi numerami rzymskimi, a ryciny (zdjęcia, rysunki, wykresy, diagramy) cyframi arabskimi. Każda tabela powinna mieć nagłówek opisujący jej treść (tytuł), a ewentualne objaśnienia należy zamieścić poniżej. Objaśnienia do umieszczenia pod wykresami, rysunkami, zdjęciami należy przesłać w osobnym pliku. Pliki cyfrowe zawierające ilustracje akceptowane do druku należy przygotować zgodnie z zaleceniami Redakcji. Ilustracje we wstępnej wersji artykułu przeznaczonej dla recenzentów mogą być dostarczone jako dowolne pliki graficzne lub tekstowe, ale w wersji ostatecznej do druku powinny być dostarczone w wymaganej rozdzielczości jako pliki TIFF albo EPS. Grafiki należy przesyłać w ich naturalnym planowanym formacie, aby nie istniała konieczność ich powiększania lub zmniejszania w Wydawnictwie. Minimalna rozdzielczość stosowana w ilustracjach powinna wynosić 300 dpi dla zdjęć szarych i kolorowych, 600 dpi dla liter i 1200 dpi dla linii w wykresach. Kolorowe ilustracje muszą pozostawać także w systemie CMYK jako obrazy CMYK TIFF o rozdzielczości 300 dpi. Pliki pochodzące z programu Microsoft Office (Power Point, Word) akceptowane są jedynie w wersji ilustracji czarno białej. Wszystkie ryciny (oprócz czarno białych z MS Office) wyeksportowane do formatu bitmapy muszą być zachowane w skali szarości albo w systemie CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, blacK). Nie należy stosować zapisu w systemie RGB (Red, Green, Blue). Obrazy stonowane (zróżnicowanie gęstości lub cienie) muszą być sporządzone w skali szarości (nie używać bitmapy). Redakcja nie akceptuje kolorowych ilustracji wykonanych w Microsoft Office, ponieważ są one zapisane w systemie RGB. Za wydruk kolorowych ilustracji Wydawca pobiera dodatkową opłatę, zgodnie z załączoną na końcu instrukcji informacją o opłatach. Jednak można przygotować wersję kolorową rycin, która zostanie nieodpłatnie opublikowana online.

Wszystkie ostateczne napisy, oznaczenia czy też klucze oznaczeń muszą być wprowadzone do rycin. Każda rycina musi zostać dołączona jako osobny plik, a ilustracje wielopanelowe muszą być podane w jednym pliku. Aby uniknąć problemu z różnymi fontami Redakcja zaleca stosowanie następujących czcionek: Times New Roman, Times New Roman Pl, Arial, Arial Pl oraz Symbol. W celu szczegółowej informacji proszę wysyłać zapytanie przez e-mail na adres Redakcji.

1.3. Piśmiennictwo

Cytowane piśmiennictwo należy wpisać oddzielnie jako ostatnie strony manuskryptu, wymieniając pozycje w kolejności alfabetycznej. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, numery stron i rok wydania (w nawiasie). Lista stosowanych nazw i skrótów czasopism znajduje się w bazie Journal Title Abbreviations Web of Science. Jeżeli jest przyjęte podawać pełną nazwę periodyku, stawiamy za nazwą przecinek [1], natomiast za każdym skróconym członem nazwy kropkę [2], np.:

1. Adams G.M., Blumenthal R.M.: Gene *pvuIIW*: a possible modulator of PvuII endonuclease subunit association. *Gene*, **157**, 193–199 (1999)
2. Beld J., Woycechowsky K.J., Hilvert D.: Diselenides as universal oxidative folding catalysts of diverse proteins. *J. Biotechnol.* **150**, 481–489 (2010)

W przypadku, gdy liczba współautorów pracy przekracza 10 (przytoczona poniżej praca jest dziełem 42 autorów), należy podać nazwiska i inicjały pierwszego oraz ostatniego współautora, a następnie dodać uwagę i wsp., np.:

1. Tomb J.F., Venter J.C. i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **338**, 539–543 (1997)

Cytacje prac z czasopism ukazujących się tylko w sieci internetowej powinny zawierać następujące dane: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, strona (lub jej odpowiednik [1]), i rok wydania (w nawiasie). W przypadku, gdy wydawnictwo nie stosuje numeracji stron [2], należy podać numer DOI, np.:

1. Esberg A., Muller L.A., McCusker J.H.: Genomic structure of and genome-wide recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* S288C progenitor isolate EM93. *Plos One*, **6**, e25211 (2011)
2. Stachowiak R., Łyżniak M., Budziszewska B.K., Roeske K., Bielecki J., Hoser G., Kawiak J.: Cytotoxicity of bacterial metabolic products, including Listeriolysin O, on leukocyte targets. *J. Biomed. Biotechnol.* DOI:10.1155/2012/954375 (2012)

Dla cytowanych wydawnictw nieperiodycznych należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora oraz współautorów, tytuł dzieła, wydawnictwo, miejsce i rok wydania. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej, np. rozdziału w książce [2], należy dodatkowo podać tytuł tej pracy oraz nazwisko jej redaktora, wydawnictwo, miejsce wydania, rok, tom oraz na końcu numery stron, np.:

1. Boulton R.B., Singleton V.L, Bisson L.F., Kunkee R.E.: Principles and practices of winemaking. Chapman Hall, New York, 1996
2. Portnoy D.A., Sun A.N., Bielecki J.E.: Escape from the phagosome and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* (w) Microbial Adhesion and Invasion, red. M. Hook, L. Świtalski, Springer, New York, 1992, s. 85–94

Powoływanie się w tekście na pozycje cytowanego piśmiennictwa następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach, np. [10], [10–12], [10, 25]. Ze względu na możliwość zmian w piśmiennictwie podczas procesu recenzowania artykułów Redakcja dopuszcza stosowanie tymczasowych odnośników. Wewnątrz nawiasów kwadratowych można wziąć w okrągły nawias odnośnik w dowolnym formacie, np. [(Adams i wsp.)]. Po uzyskaniu akceptacji artykułu należy zamienić formatowanie odnośników na docelowe. Redakcja zaleca stosowanie programów do zarządzania piśmiennictwem. Liczba cytowań w piśmiennictwie nie może przekraczać 100 pozycji.

1.4. Cytowanie danych z sieci internetowej

Preferowane jest cytowanie informacji pochodzących z prac oryginalnych wydawanych przez uznane w środowisku naukowym oraz recenzowane czasopisma. Warunkiem koniecznym przy użyciu informacji ze strony internetowej jest sprawdzenie i aktualizacja zapisu informacyjnego na stronie WEB w dniu wysyłania pliku. W przypadku niewłaściwego adresu i niemożliwości odtworzenia informacji z sieci komputerowej, prace będą zwracane autorom. Cytowanie informacji publikowanej na stronach sieci internetowej powinno wyglądać następująco: autorzy (jeśli są znani [1]) lub nazwa organizacji [2] (wydawca strony), tytuł artykułu, nazwa strony (jeśli nie została już wcześniej podana), data publikacji (jeśli została podana [3]), adres www, data ostatniego sprawdzenia adresu, np.:

1. Harmon K.: Ancient „Fossil" virus shows infection to be millions of years old. Scientific American, http://www.scientificamerican.com/article/fossil-virus-bird-genome (31.12.2015)
2. World Health Organization: Poliomyelitis, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/en (06.03.2014)
3. World Health Organization: What we know about transmission of the Ebola virus among humans. Ebola situation assessment, 06.10.2014, http://www.who.int/mediacentre/news/ebola/06-october-2014 (31.12.2015)

2. Prawo autorskie

W polskim prawodawstwie autorskie prawo osobiste interesujące szczególnie autorów *Postępów Mikrobiologii* oraz autorskie prawo majątkowe reguluje Ustawa z dn. 4. lutego 1994 r. (Dz.U. Nr 90, poz. 631 ze zm.).

Autorskie prawo osobiste, zwane dalej w **Informacji dla Autorów** prawem autorskim dotyczy niemajątkowych interesów twórcy związanych z danym utworem oraz określa zasady ochrony więzi twórcy z utworem. Do praw tych między innymi należy:

- prawo do autorstwa utworu wyrażające m.in. zakaz „przywłaszczania" utworu przez inne niż twórca osoby (zakaz dokonywania plagiatów).
- prawo do oznaczenia utworu swoim nazwiskiem albo udostępnienia utworu anonimowo.
- prawo do nienaruszalności treści i formy utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

Konieczność ochrony autorskich praw osobistych innych autorów przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii* obliguje nas do przyjęcia następującej procedury:

(a) Reprodukcja utworów wytworzonych przez innych Autorów w pracy własnej, przesłane do opublikowania w *Postępach Mikrobiologii* tj. cudzych rycin lub tabel – pochodzących z oryginalnej, pierwotnej pracy innego Autora – bądź cytowanie fragmentów cudzego tekstu, wymaga od Autorów wcześniejszego uzyskania przez nich pisemnej zgody od Wydawnictwa lub Autorów pierwotnej pracy (z której materiały te pochodzą) na ich reprodukcję. Zgodę tę w formie oryginalnego zaświadczenia należy przysłać wraz z materiałami reprodukowanymi do Redakcji *Postępów Mikrobiologii*.

- Pod cytowaną rycinę należy w opisie podać nazwisko pierwotnego Autora, pełną bibliografię pracy, z której pochodzi ilustracja oraz informację o zgodzie Wydawnictwa lub Autora na jego reprodukcję.
- Cytowany tekst powinien być wyraźnie oznaczony w odpowiednim miejscu manuskryptu, zaś u dołu strony powinna być zamieszczona informacja dotycząca pochodzenia cytatu oraz uzyskanej zgody na przedruk.

(b) Dozwolone jest wprowadzanie zmian w cytowanych rycinach innych Autorów/twórców pod warunkiem każdorazowego uzyskania ich zgody (lub osób upoważnionych przez nich) na dokonanie takich zmian. Zmiany w oryginalnych ilustracjach mogą wynikać z chęci Autorów do dokonania nowego opracowania lub nowego przedstawienia omawianego przez siebie zagadnienia. W tych przypadkach wskazane jest, aby zgoda twórcy wskazywała na zakres dokonywanych zmian, gdyż pozwoli to uniknąć wątpliwości odnośnie zakresu wyrażonej tak zgody. Wreszcie konieczność uzyskania zgody pierwotnego Autora/twórcy na

dokonanie zmian w reprodukowanym elemencie graficznym wynika z możliwości ingerencji Autorów w autorskie prawo osobiste w postaci nienaruszalności formy i treści utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

(c) Warunkiem przyjęcia przez Redakcję manuskryptu pracy oraz poddania jej dalszej procedurze wydawniczej jest złożenie wraz z manuskryptem oświadczenia dotyczącego praw autorskich.

3. Zalecenia szczegółowe*

3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów

Należy stosować dwuczłonowe nazwy zawierające nazwę rodzajową oraz gatunkową (np. *Escherichia coli*). Nazwy rodzajowe mogą być użyte bez nazwy gatunkowej, natomiast nie można użyć samych tylko nazw gatunkowych. Gdy w pracy podaje się pierwszy raz nazwę gatunku, musi ona składać się z pełnych wyrazów, przy ponownym jej użyciu, podaje się tylko pierwszą literę nazwy rodzajowej (zawsze dużą) oraz nazwę gatunkową w pełnym brzmieniu np. *E. coli*. Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa należy pisać kursywą. Informacje szczegółowe dotyczące pisowni oraz prawidłowego nazewnictwa (zgodnego z wymogami współczesnej systematyki) – przyjęte przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii,* za instrukcją ASM – można znaleźć w **Instructions to Authors,** *J. Bacteriol.* Ponadto, Redakcja zwraca uwagę, by nie rozpoczynać zdań od nazw łacińskich.

Zgodnie z propozycjami WHO – Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* ("Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars" (M. Y. Popoff i L. Le Minor, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 1997) and "Identification and Serotyping of *Salmonella* and an Update of the Kaufmann-White Scheme" (A.C. McWhorter-Murlin and F. W. Hickman-Brenner, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.) do rodzaju *Salmonella* należą tylko dwa gatunki, tj. *S. enterica* i *S. bongori,* z których pierwszy podzielony został na 6 podgatunków. Stosowane dotychczas zwyczajowe nazwy, nie mające statusu taksonomicznego, takie jak **serotyp**, **typ serologiczny**, zostały zastąpione nazwą **serowaru** (w oryginale **serovar**, sv.). Nazwę serowaru należy pisać dużą literą oraz prostym pismem (np. Typhi, Paratyphi B, Typhimurium, itp.). Zgodnie z powyższym, nazwę pierwszego podgatunku rodzaju *Salmonella* można zapisać: *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium lub *Salmonella* subsp. I. ser. Typhimurium, bądź, po prostu, *Salmonella* Typhimurium.

Zgodnie z rekomendacją International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) pełne, oficjalne nazwy wirusów zapisujemy kursywą, np.: *Influenza A virus*, *Human Immunodeficiency Virus*, *Human Papillomavirus.* Nazwy potoczne i skróty, jak wirus grypy, HIV, HPV zapisujemy używając standardowej czcionki.

3.2. Nomenklatura genetyczna

Właściwości genetyczne szczepu opisywane są w terminach fenotypu oraz genotypu. Fenotyp opisuje obserwowane właściwości organizmu. Genotyp określa genetyczną strukturę organizmu, zwykle odnosi się do szczepu dzikiego. Wyżej wymienione określenia są bliżej objaśnione w pracy Demerec i wsp.: *Genetics*, **54**, 61–76 (1966).

(a) Fenotypowe określenie właściwości organizmu stosuje się, gdy zmutowane loci nie zostały zidentyfikowane oraz zmapowane. Może być także użyte w przypadku, gdy identyfikuje się produkt genu, np. białko OmpA. Zapis fenotypu zasadniczo składa się z trzech liter, nie można ich pisać kursywą, pierwsza litera powinna być zawsze dużą literą. Preferuje się użycie liczb rzymskich lub arabskich dla oznaczania bliźniaczych fenotypów, np. Pol1, Pol2, Pol3, itd. Typ dziki można zapisać dodatkowym oznaczeniem *plus* (Pol^+); w odróżnieniu do tego oznaczenie *minus* określać będzie fenotyp mutanta (Pol^-). Charakterystyczne właściwości organizmu można zapisać używając liter, np. Str^S. Fenotypy oporności determinowane plazmidowo określa się kodem dwuliterowym, np. Ap^r, a chromosomowo – kodem trzyliterowym, np. Amp^r.

(b) Genotypowe oznaczenia są podobne do fenotypowych – w obu przypadkach stosuje się zestaw trzech liter; genotyp pisze się zawsze małymi literami oraz kursywą, np. *ara, his, rps.* Promotor, terminator oraz operator oznacza się literami *p, t* oraz *o*, np. *lacZp, lacZt, lacZo;* Bachman B.J., Low K.B.; *Microbiol. Rev.* **44**, 1–56 (1980).

(c) Typ dziki alleli można zaznaczyć wpisując dodatkowe oznaczenie plus nad oznaczeniem genu, np. ara^+, his^+, nie oznacza się natomiast zmutowanych alleli znakiem minus.

(d) Miejsca mutacji oznacza się poprzez wstawiania liczby kolejnych izolacji (liczby alleli) po symbolu zmutowanego locus (np. *araA1, araA2* itp.). W przypadku, gdy tylko jedno takie locus istnieje, lub gdy nie wiadomo, w którym kolejnym locus mutacja powstała – po oznaczeniu genu wstawia się myślnik w miejscu dużej litery oznaczającej locus, zaś dalej podaje się liczbę izolacji (np. *ara*-23).

(e) Zapis genotypu może być wzbogacony innymi oznaczeniami, jak *plus* dla typu dzikiego – można wprowadzić oznaczenia określające mutacje, np. mutacja Amber (Am), mutant termowrażliwy (Ts), mutant konstytutywny (Con), mutant wrażliwy na niskie temperatury (Cs), białko hybrydowe (Hyb) np. *araA230*(Am), *his D21*(Ts). Wprowadzanie innych wzbogaceń powinno być poprzedzone w tekście odpowiednim wyjaśnieniem.

(f) Dodatkowe oznaczenia mogą też być użyte w przypadku konieczności rozróżnienia tego samego genu znajdującego się w różnych organizmach lub szczepach tego samego gatunku, np. $his_{E.coli}$ lub $his_{K\text{-}12}$. Dodatkowe oznaczenia stosuje się również dla rozróżnienia pomiędzy genetycznymi elementami o tej samej nazwie np. promotory operonu *gln*, $glnA_1$ i $glnA_2$.

(g) Delecję oznacza się symbolem, Δ usytuowanym przed nazwą usuniętego genu lub regionu, np. Δ *trpA432,* Δ *(aroP--aceE)419,* lub Δ *his(dhuA hisJ hisQ)1256.* Fuzję genów *ara* i *lac* można przedstawić w ten sam sposób – *F (ara-lac)1256*. Podobnie F (*araB*'-$lacZ^+$)(Hyb) oznacza, że fuzja nastąpiła pomiędzy genami *araB* a *lacZ*. Inwersja jest oznaczana następująco IN (*rrnD-rrnE)1.* Insercję genu *his E. coli* do plazmidu pSC101 w pozycji 0 zasad (0kb) zapisuje się następująco pSC101 W (0kb::K-12*hisB*)4. Oznaczenie obecności episomu polega na podaniu jego symboli w nawiasie po nazwie szczepu rodzicielskiego, np. W3110/F' 8(gal^+).

3.3. Skróty nazw chemicznych

Nie wymagają dodatkowych wyjaśnień skróty:

- nazw miar i wag regulowanych przez Systeme International dc Unites (SI), ogólnie akcetowane jednostki takie jak: bp, kb, Da, masa cząst., m. cząst.,
- nazw chemicznych takich jak: DNA, cDNA, RNA, cRNA, RNaza, DNaza, rRNA, mRNA, tRNA; AMP, ADP, ATP, dATP,ddATP, GTP itp.,
- ATPaza, dGTPaza itp. NAD^+,NADH, NADPH, $NADP^+$, poly(A), poly(dT), itp.,
- nazw powszechnie stosowanych technik biologii molekularnej, np. PCR, SDS-PAGE, nazw ogólnie znanych linii komórkowych, np. HeLa, J774,
- nazw jednostek biologicznych, np.: PFU (jednostka formowania łysinek), JTK (jednostka tworząca kolonię), MIC (minimalne stężenia hamujące wzrost), itp.,

* fragmenty instrukcji dla autorów czasopism wydawanych przez American Society for Microbiology – wykorzystywanie w *P. M.* za zgodą Journals Departments ASM

Zasady kształtowania nomenklatury endonukleaz restrykcyjnych oraz metylotransferaz zostały opublikowane w *Nucleic Acids Res.* **31**, 1805–1812 (2003). Przy pisaniu prac prosimy o korzystanie z zawartych tam informacji.

3.4. Pisownia danych numerycznych

Standardowe jednostki metryczne są stosowane dla określania długości, wagi i objętości. W przypadku przedstawiania tych wartości oraz molarności należy stosować przedrostki m, μ, n oraz p dla wartości 10^{-3}, 10^{-6}, 10^{-9} oraz 10^{-12}. Temperaturę należy przedstawiać tylko w stopniach Celsjusza, np. 37°C, a zawartość substancji w danej jednostce (stężenie) w formie g/ml.

3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami

Jeśli wyznakowana jest pojedyncza cząsteczka w związku chemicznym, nazwę tego związku należy zapisać w następujący sposób: $^{14}CO_2$, $^{3}H_2O$, $H_2{}^{35}SO_4$. Taki sam sposób zapisu stosuje się, gdy radioaktywna cząsteczka nie występuje w naturalnej formie wyznakowanego związku, np. ^{32}S-ATP lub gdy symbol izotopu związany jest z niespecyficzną nazwą związku, np. ^{14}C aminokwasy, ^{3}H-liganty, itp. W przypadku niektórych specyficznych związków chemicznych można stosować nawiasy kwadratowe obejmujące symbole radioaktywnej cząsteczki przed nazwą chemiczną związku, np. [^{14}C] mocznik, L-[*metylo*-^{14}C] metionina, [g $^{-32}$P] ATP.

4. Proces recenzowania

Prace przysyłane do Redakcji w celu ich opublikowania w *Postępach Mikrobiologii* podlegają podwójnej ocenie, tj. ich wartości merytorycznej (recenzje) oraz poprawności pod względem redakcyjnym (układ pracy, język, załączniki ilustrujące tekst, oświadczenia autorów).

- Każda praca przesłana do Redakcji jest oceniana przez Zespół Redakcyjny i jednego ze stałych Recenzentów z Rady Redakcyjnej *Postępów Mikrobiologii* (skład Rady Redakcyjnej jest publikowany w każdym zeszycie *Postępów Mikrobiologii* oraz na stronie internetowej http:www.pm.microbiology.pl). W przypadku braku w Radzie Redakcyjnej Recenzenta o odpowiedniej specjalności lub z innych ważnych przyczyn, Redakcja powołuje Recenzenta spoza Rady Redakcyjnej (lista Recenzentów jest publikowana w ostatnim zeszycie każdego tomu).
- Recenzje są anonimowe oraz dokonywane na specjalnie do tego celu przygotowanych arkuszach (wzór kwestionariusza można pobrać z naszej strony internetowej).
- Recenzenci za wykonaną pracę nie otrzymują honorarium.
- Nazwiska Recenzentów spoza Rady Redakcyjnej są wraz z podziękowaniami publikowane ostatnim zeszycie *Postępów Mikrobiologii* odpowiedniego roku.
- W przypadku negatywnej oceny pracy przez Recenzenta oraz jego sugestii skierowanej do Redaktora Naczelnego odrzucenia recenzowanej pracy, bądź jej znacznego przeredagowania, Autor ma prawo odwołania się od tej opinii do Redaktora Naczelnego. W opisywanym przypadku decyzją Redaktora powoływany jest dodatkowy Recenzent spoza Rady Redakcyjnej *Postępów Mikrobiologii*.

5. Sposób przygotowania i nadesłania manuskryptu

Pracę wraz z kompletem oświadczeń należy przesyłać na adres poczty elektronicznej Redakcji:

e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przeglądowe przygotowane zgodnie z ogólną instrukcją dla Autorów oraz zasadami wymienionymi w informacjach dotyczących prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" należy przesłać w wersji elektronicznej na adres Redaktora Działu:

Prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba

e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@pum.edu.pl

Przed wysłaniem pracy do Redakcji prosimy o sprawdzenie kompletności wysyłanych plików zgodnie z poniższą listą:

I Manuskrypt

1. Strona tytułowa ze streszczeniem
2. Manuskrypt (zawierający tytuł oraz właściwy tekst pracy)
3. Ryciny
4. Opis do rycin
5. Tabele

II Wymagane dokumenty

1. Deklaracja oryginalności pracy
2. Oświadczenie dotyczące praw autorskich
3. Oświadczenie dotyczące konfliktu interesów

Wzory oświadczeń znajdują się w niniejszej instrukcji, można też pobrać edytowalny plik ze strony *Postępów Mikrobiologii*.

6. Uwagi dodatkowe

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonywania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się Autorowi manuskrypt pracy w celu dokonania poprawek. Adresy instytucji, w których pracują autorzy (adres pocztowy oraz e-mail) należy podawać w pracy na dole strony tytułowej. Prace nie odpowiadające wymaganiom Redakcji będą odsyłane autorom bez rozpatrzenia merytorycznego. Za datę wpływu przyjmuje się dzień otrzymania pracy w formie zgodnej z instrukcją dla autorów. Jako datę przyjęcia do druku przyjmuje się dzień, w którym Redakcja powiadamia Autorów, że praca została zakwalifikowana do druku. Za prace opublikowane w *Postępach Mikrobiologii* nie przewiduje się honorariów autorskich. Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów pobierane są opłaty za prace przyjmowane do druku w *Postępach Mikrobiologii*. Przesłanie kompletu podpisanych oświadczeń, w tym zobowiązania do zapłaty za artykuł zakwalifikowany do wydania, jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej.

INFORMACJA DLA AUTORÓW
o opłatach za prace publikowane w *Postępach Mikrobiologii*

Uprzejmie informujemy PT Autorów, że zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów z dnia 6 lutego 2007 roku oraz z dnia 2 marca 2011 r. wprowadzono zasady płatności za prace przyjmowane do druku w naszym czasopiśmie w wysokości 250 zł + VAT 23% – razem 307,50 zł za każdy artykuł.

Informujemy również, że Zarząd Główny PTM dnia 23 listopada 2016 r. uchwałą nr 24 podjął decyzję o zróżnicowaniu opłat za druk publikacji od dnia 1 stycznia 2018 r. Jeżeli Autor nie będzie członkiem PTM, lub jako członek PTM nie będzie miał opłaconych składek w roku bieżącym lub w ubiegłych latach – obowiązywać będzie opłata w wysokości 350 zł + VAT 23% (430,50 zł). Dla Autorów będącymi aktywnymi członkami PTM (uregulowane opłaty składek członkowskich w roku bieżącym i ubiegłych latach) obowiązywać będzie aktualna opłata w wysokości 250 zł + VAT 23% (307,50 zł).

Autorzy manuskryptów proszeni są o wnoszenie opłat na **konto Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów:**

BGŻ SA 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550

Opłatę można wnosić indywidualnie. W imieniu Autorów opłatę może wnosić sponsorująca instytucja, fundacja, itp. W takim przypadku należy przesłać do Redakcji informacje potrzebne do wystawienia faktury. Opłatę należy wnieść po otrzymaniu faktury. W przypadku, gdy faktura nie jest potrzebna do dokonania wpłaty (opłata indywidualna) przelewu należy dokonać po uzyskaniu od Redakcji informacji, że praca została przyjęta do druku. Dodatkowo, Wydawca pobiera opłaty za wydruk kolorowych ilustracji w wysokości 300 zł + VAT 23% (369 zł) za stronę.

Otrzymanie przez Redakcję pracy wraz z zobowiązaniem zapłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. Do zobowiązania zapłaty należy dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko Autora korespondencyjnego.

INFORMACJE DOTYCZĄCE PRAC DRUKOWANYCH W DZIALE PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

W dziale zatytułowanym **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY** publikowane są artykuły przeglądowe o charakterze metodycznym, reprezentujące dowolną dziedzinę mikrobiologii. Redakcja *Postępów Mikrobiologii*, w porozumieniu z Zarządem Głównym PTM ustaliła, iż drukowanych będzie rocznie nie więcej niż cztery artykuły tej kategorii.

Redaktorem odpowiedzialnym za wartość merytoryczną, redakcję tekstu oraz ostateczne przyjęcie pracy do druku jest prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba (**adres: ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo, tel. 605031324, fax: (91) 3113186, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@pum.edu.pl)**

Prace metodyczne przeznaczone do druku podlegają ocenie dokonywanej przez stałych Recenzentów lub Ekspertów powoływanych każdorazowo przez Redaktora Działu.

Lista stałych Recenzentów, patrz Zalecenia dla Autorów, pkt. 5.

Strona tytułowa każdego artykułu zaopatrzona będzie w informacje, iż praca należy do **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW** oraz każdorazowo podana będzie data otrzymania od Autorów manuskryptu jak i data zaakceptowania go do druku.

<u>Zalecenia dla Autorów:</u>

1. **Przesyłanie publikacji:**
   - Manuskrypt wraz z rycinami, tabelami proszę przesyłać bezpośrednio do Redaktora **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW**.
   - Podając adres/y Autorów publikacji należy zaznaczyć Autora korespondencyjnego – prócz adresu pocztowego, numeru telefonu i ewentualnie faksu. Należy obligatoryjnie podać adres e-mail Autora korespondencyjnego.
2. **Sposób przygotowania manuskryptu** – pracę należy opracować zgodnie z ogólnymi zaleceniami zawartymi w INFORMACJI DLA AUTORÓW aktualnie wydanego Tomu *Postępów Mikrobiologii* (Zeszyt 1) z uwzględnieniem następujących zmian:
   - Objętość pracy wraz z piśmiennictwem i ilustracjami nie może przekraczać 20 stron .
   - Liczba cytowań w rozdziale **Piśmiennictwo** nie powinna przekraczać 50 pozycji.
   - W wykazie cytowanego piśmiennictwa należy umieszczać wyłącznie prace drukowane w czasopismach naukowych. Niedopuszczalne jest zamieszczanie danych bibliograficznych prospektów reklamowych lub promocyjnych firm farmaceutycznych.
3. **Prawa autorskie** – do każdej przygotowanej do druku publikacji załączyć **oświadczenie dotyczące praw autorskich.** Wzór oświadczenia można pobrać ze strony internetowej *Postępów Mikrobiologii.*
4. **Zalecenia i uwagi dodatkowe:**

W celu uniknięcia kryptoreklamy, proszę o zwrócenie szczególnej uwagi na sposób przedstawienia czytelnikom produktów komercyjnych lub metod opracowanych przez producentów. Autorzy są również zobowiązani do ujawnienia (jeżeli takie istnieją) wszelkich powiązań (honoraria, granty, płatne ekspertyzy lub inne formy uzyskiwania korzyści osobistych) między Autorami a firmą, której produkt ma istotne znaczenie w nadesłanej pracy. W tym celu każdy z Autorów proszony jest o złożenie oświadczenia o oryginalności pracy, oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów". Konflikt interesów występuje, kiedy Autor lub zakład pracy Autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje. Wzór deklaracji można pobrać ze strony internetowej *Postępów Mikrobiologii.*

- Redakcja zastrzega sobie prawo ostatecznej decyzji o akceptacji pracy przeznaczonej do druku w dziale **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY.**
- Wszelkie proponowane zmiany w **INFORMACJI DLA AUTORÓW** zostaną przedstawione PT Czytelnikom *Postępów Mikrobiologii* przed ich wprowadzeniem.

5. **Stali recenzenci działu PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY:**

Jerzy Długoński (Uniwersytet Łódzki)
Waleria Hryniewicz (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego)
Anna Przondo-Mordarska (Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu)

Oświadczenie o oryginalności pracy

.....
Nazwisko i imię Autora (korespondencyjnego)

.....

.....
Tytuł pracy

.....
Data złożenia pracy w Redakcji *Postępów Mikrobiologii*

Oświadczam, że złożona przeze mnie praca, zatytułowana jak wyżej, jest moim oryginalnym utworem i stanowi przedmiot prawa autorskiego w myśl Ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dn. 4 lutego 1994 r.

Oświadczam również, że praca ta ani w całości, ani we fragmentach nie została opublikowana wcześniej w żadnym innym czasopiśmie lub wydawnictwie naukowym. Dodatkowo stwierdzam, iż w/w pracy nie wysłano równolegle do opublikowania w innym czasopiśmie naukowym lub wydawnictwie.

....
(miejsce, data) (podpis Autora korespondencyjnego)

— —

Oświadczenie dotyczące praw Autorskich

1. .....

.....
(nazwisko/a i imię/ona Autora/ów – proszę podkreślić Autora korespondencyjnego)

Adres Autorów: .....

.....

Tytuł pracy: .....

.....

2. **Oświadczenie** (proszę wypełnić a lub b)

(a) Oświadczam, iż w mojej/naszej pracy przeznaczone do opublikowania ryciny oraz tabele, są dziełem mojej/naszej oryginalnej twórczości (tzn. zostały wymyślone i zaprojektowane przez Autorów przedkładanego Redakcji manuskryptu), nie są obciążone jakimikolwiek prawami osób trzecich, ani nie naruszają jakichkolwiek przepisów prawa i interesów dóbr osób trzecich. W pracy nie ma cytatów z obcej publikacji/ ewentualnie w pracy zamieszono cytaty w ramach dozwolonego prawnie prawa cytatu, przy czym wszystkie zamieszczone cytaty zostały należycie oznaczone wraz z wymienieniem twórcy i źródła cytatu.

....
(miejsce, data) (podpis Autora korespondencyjnego)

(b) Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję rycin

nr: ....., zamieszczonych w*: .....

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję tabel

nr: ....., zamieszczonych w: .....
(* podać bibliografie prac oryginalnych z których reprodukowane będą ryciny lub tabele)

Do Oświadczenia załączam oryginalne zezwolenia reprodukcji w liczbie: .....

rycin: ..... tabel: ..... cytowanego tekstu: .....

....
(miejsce, data) (podpis Autora korespondencyjnego)

Oświadczenie dotyczące „konfliktu interesów”[1]

1. Nazwisko i imię Autora: .....

2. Tytuł pracy: .....

.....

.....

3. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b, niepotrzebne skreślić)

(a) Oświadczam, że „konflikt interesów” nie występuje

(b) Oświadczam, że występuje „konflikt interesów”, który polega na: .....

.....

....

(miejsce, data) (podpis Autora korespondencyjnego)

[1] Konflikt interesów występuje, kiedy Autor lub zakład pracy Autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje.

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW PRAC PUBLIKOWANYCH W SUPLEMENTACH DO KWARTALNIKA POSTĘPY MIKROBIOLOGII

W celu ułatwienia publikowania w jednym miejscu artykułów o podobnej problematyce, *Postępy Mikrobiologii* wydawać będą w formie suplementów, następujące prace naukowe:

1. Referaty z sesji plenarnych Zjazdów naukowych, Konferencji naukowych oraz Sympozjów organizowanych staraniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Manuskrypt pojedynczego referatu nie powinien przekraczać 25 stron i powinien być przygotowany wg Informacji dla Autorów *Postępów Mikrobiologii*. Całość materiałów przygotowanych do jednego suplementu nie może przekraczać 150 stron.
2. Streszczenia przyjętych przez organizatorów referatów oraz doniesień prezentowanych na zjazdach naukowych, konferencjach oraz sympozjach. Streszczenie nie powinno przekraczać jednej strony tekstu i kończyć się nie więcej jak trzema pozycjami cytowanego piśmiennictwa.

W suplemencie nie będą publikowane oryginalne prace doświadczalne prezentowane na zjazdach naukowych. Prace te po odpowiednim przygotowaniu, zgodnie z instrukcją dla autorów, można przesyłać do Redakcji *Polish Journal of Microbiology* lub innego czasopisma naukowego.

Autorzy lub zamawiający suplement ponoszą pełny koszt jego opracowania oraz wydania. Możliwy jest druk czterech suplementów rocznie. Ponieważ materiały przeznaczone do suplementu nie są opracowywane oraz nie podlegają ocenie Zespołu Redakcyjnego *Postępów Mikrobiologii*, zamawiający suplement, tj. osoba upoważniona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, bierze całkowitą odpowiedzialność za redakcję oraz wartość merytoryczną suplementu. Wydanie suplementu powinno być poprzedzone jego akceptacją przez Radę Redakcyjną *Postępów Mikrobiologii.*

Oferta Reklamy

Postępy Mikrobiologii udostępnią w każdym numerze kilka stron (łącznie z wewnętrznymi stronami okładek) **reklamie**.

Czasopismo *Postępy Mikrobiologii* dociera co kwartał do kilku tysięcy odbiorców. Są wśród nich specjaliści różnych dziedzin mikrobiologii, pracujący jako nauczyciele wyższych uczelni, szkół średnich oraz pracownicy naukowi instytutów badawczych, biotechnolodzy oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

Proponujemy zamieszczenie reklam i ogłoszeń dotyczących mikrobiologii, czarno-białych lub kolorowych – forma i cena do uzgodnienia z Zakładem Wydawniczym Letter Quality tel: 607 217 879, email: roma.walendzewicz@gmail.com

Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń.

SPIS TREŚCI

Prof. dr hab. Roman Mycielski (1933–2017) 3
K. Góralska, M. Dzikowiec – Udział mikrobioty w utrzymaniu homeostazy organizmu człowieka 5
G.M. Cech, A. Szalewska-Pałasz – Białko Hfq – nowe oblicza dobrze znanego ryboregulatora 12
K.W. Pancer – Pandemiczne koronawirusy człowieka – charakterystyka oraz porównanie wybranych właściwości HCoV-SARS i HCoV-MERS 22
M. Wiciński, K. Leis, B. Malinowski, M.M. Węclewicz, E. Grześk, G. Grześk – Papillomawirusy: HPV jako czynnik etiologiczny nowotworów głowy i szyi 33
S. Tylewska-Wierzbanowska, B. Fiecek, T. Chmielewski – Gorączki powrotne 41
K. Piekarska – Mechanizmy oporności na fluorochinolony kodowane plazmidowo – PMQR 47
P. Cieślik, J. Knap, A. Bielawska-Drózd – *Francisella tularensis* – przegląd 58
M. Wiciński, K. Leis, M.M. Węclewicz, B. Malinowski, J. Żak, E. Grześk, G. Grześk – *Nocardia* spp. – charakterystyka, chorobotwórczość, leczenie 68

KOMUNIKATY, INFORMACJE 77

INFORMACJA DLA AUTORÓW 83

CONTENTS

Prof. dr hab. Roman Mycielski (1933–2017) 3
K. Góralska, M. Dzikowiec – Role of microbiota in maintaining the homeostasis in the human body 5
G.M. Cech, A. Szalewska-Pałasz – The Hfq protein – a novel view on the well-known riboregulator 12
K.W. Pancer – Pandemic *Human Coronavirus* – characterization and comparison of selected properties of HCoV-SARS and HCoV-MERS 22
M. Wiciński, K. Leis, B. Malinowski, M.M. Węclewicz, E. Grześk, G. Grześk – Papillomaviruses: HPV as the etiological factor of head and neck cancers 33
S. Tylewska-Wierzbanowska, B. Fiecek, T. Chmielewski – Relapsing fevers 41
K. Piekarska – Plasmid-mediated quinolone resistance – PMQR 47
P. Cieślik, J. Knap, A. Bielawska-Drózd – *Francisella tularensis* – review 58
M. Wiciński, K. Leis, M.M. Węclewicz, B. Malinowski, J. Żak, E. Grześk, G. Grześk – *Nocardia* spp. – characteristics, pathogenicity, treatment 68

NEW REPORTS, INFORMATION 77

INFORMATION FOR AUTHORS 83