Kwartalnik
Tom 57
Zeszyt 2•2018
KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:
PMKMAV 57 (2)
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, 2, 95–105
http://www.pm.microbiology.pl

WKŁAD MIKROBIOLOGII WETERYNARYJNEJ W BUDOWĘ IDEI WSPÓLNEGO ZDROWIA

Marian Binek*, Magdalena Kizerwetter-Świda, Dorota Chrobak-Chmiel

Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w październiku 2017 r., zaakceptowano w marcu 2018 r.

Streszczenie: Pojawienie się na przełomie XX i XXI wieku wielu nowych i powracających chorób uświadomiło ludziom na całym świecie poważne zagrożenia z ich strony dla zdrowia publicznego. Wspomniane choroby w większości wywoływane są przez wirusy rezerwuaru zwierząt wolnożyjących, zdolnych do przełamywania bariery gatunkowej. Zmieniający się obraz chorób w skali globalnej rodzi potrzebę im przeciwdziałania w oparciu o strategię uwzgledniającą porozumienie i współdziałanie wielu specjalistów z zakresu ochrony zdrowia ludzi i zwierząt oraz ochrony środowiska. Powyższa idea znana jest na świecie jako 'One Health' (jedno zdrowie) i sięga w swoich założeniach do czasów starożytnych do narodzin medycyny traktowanej jako jedna, tzn. o identycznym podejściu do chorób u ludzi i zwierząt. Utworzenie w drugiej połowy XVIII wieku, pierwszych w Europie Szkół weterynaryjnych, traktowane było jako zerwanie z pełnej ignorancji i brutalności traktowaniem zwierząt i zapewnieniem im opieki medycznej, opartej na specjalistycznej wiedzy, przez lekarzy weterynarii. Koniec XIX wieku obfituje w odkrycia wielu czynników etiologicznych chorób u ludzi i zwierząt i jest również okresem narodzin bakteriologii weterynaryjnej. W ciągu XX i początku XXI wieku idea jednego zdrowia ulega poszerzeniu o wątki nawiązujące do wpływu szeroko rozumianego środowiska i zwierząt wolnożyjących na powstawanie nowych chorób. Opisana sytuacja spowodowała, że idea jednego zdrowia zyskała na znaczeniu, jak również ujawniła zapotrzebowanie na specjalistów nowej generacji, w tym mikrobiologów znających nie tylko techniki diagnostyczne, ale również rozumiejących patogenezę pojawiających się chorób i przygotowanych do opracowywania strategii ich kontroli.

1. Wstęp. 2. Jedna medycyna od starożytności do XVIII w. 3. Wyodrębnianie się medycyny weterynaryjnej. 4. Mikrobiologia w medycynie weterynaryjnej. 5. Idea jednego zdrowia w medycynie XX-wiecznej. 6. Podsumowanie

Contribution of veterinary microbiology to the 'One Health' idea

Abstract: In recent years, there have been notable increas in the occurrence of emerging and reemerging infectious diseases. Most have resulted from the crossing of species barriers from animals to humans, especially from wildlife reservoirs. These threats draw attention to the changing patterns of diseases on a global scale and raise the need for a new worldwide strategy for expanding interdisciplinary collaborations and communications in all aspects of health care for humans, animals and the environment. The most commonly used term for this concept is 'One Health'. Its origin lies in pre-modern medicine and refers to the idea of One Medicine which means that there is no difference between humans and animals when it comes to the approach to health and disease. The creation of veterinary schools across Europe in the late 18th and 19th centuries is portrayed as a break with the past, in which a new enlightened approach to animal healing superseded that of ignorance and cruelty. At the end of the 19th century, discovery upon discovery was rapidly made in the domain of bacteriology and immunology. Animal diseases were first studied, and veterinary medicine and veterinary bacteriology was closely linked with these findings. Throughout the 20th and 21st centuries, 'One Health' concept broke new ground in its concern with the environmental and wildlife aspects of health. This change in thought pattern has been fueled by a number of high-profile international infectious disease events over the past decades. To continue the implementation of the 'One Health' idea, the next generation of infectious disease specialists needs to be acquainted not only with modern diagnostic technics, but also equipped to understand disease pathogenesis and the basic principles underlying disease control.

1. Introduction. 2. One medicine, from ancient times until the XVIII century. 3. Divergence of veterinary medicine. 4. Microbiology in veterinary medicine. 5. 'One Health' in XX-century medicine. 6. Concluding remarks

Słowa kluczowe: idea jednego zdrowia, nowe i powracające choroby, powstanie mikrobiologii weterynaryjnej, zwierzęcy rezerwuar patogenów
Key words: One Health, emerging and reemerging infectious diseases, creation of veterinary microbiology, animal reservoir of pathogens

1. Wstęp

Ludzie nie żyją w izolacji i stanowią część świata jako całości. Powiązani ze składowymi ekosystemu, podlegają jego oddziaływaniu, podobnie, jak i sami istotnie go kształtują. Wszystkie zatem zdarzenia, które mają wpływ na destabilizację ekosystemu skutkują zaburzeniami jego funkcji, określane również zaburzeniem „zdrowia", a więc przekładających się na zdrowie ludzi i zwierząt [38]. Działania człowieka, które przyczyniają się do zaburzeń w ekosystemie Edward O. Wilson określił terminem HIPPO, od angielskich terminów; Habitat destruction (niszczenie siedliska), Invasive species (gatunki inwazyjne), Pollution (skażenie), Population w znaczeniu human overpopulation (przeludnienie) i Overharvesting (rabunkowa eksploatacja) [1]. Dotychczas wiele osób i instytucji, definiując zdrowie skupiało się na człowieku, a celem podejmowanych działań było wyłącznie zachowanie zdrowia ludzkiego. Pojęcie zdrowia z czasem ewaluowało

* Autor korespondencyjny: Marian Binek, Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Ciszewskiego 8, 02-786, Warszawa; e-mail: marian_binek@sggw.pl

i z perspektywy ostatnich dekad na zjawisko to patrzymy szerzej z uwzględnieniem współzależności wszystkich składowych ekosystemu, w tym zarówno zbiorowych zachowań ludzkich, jak i instytucjonalnych. Powyższe relacje można zawrzeć w akronimie HEALTH, na który składają się, z angielskiego; Humans (ludzie), Ecosystems (ekosystemy), Animals (zwierzęta) Living (życie), Together (razem) i Harmoniously (harmonijnie) [16]. W takim zatem znaczeniu, zdrowie dotyczy całego ekosystemu, na którego jedność składa się kontinuum przypadków i ich skutków.

W ramach tak rozumianego jednego zdrowia przecinają się więc wątki dotyczące ludzi, zwierząt i środowiska. Poparciem dla tezy, że zdrowie człowieka zależy od „zdrowia ekosystemu" są pojawiające się zagrożenia obserwowane na przestrzeni ostatnich 3 dekad, głownie ze strony chorób spowodowanych przez RNA wirusy. Nie są to zwykle nowe wirusy, ponieważ większość można zakwalifikować do znanych rodzin i rodzajów [2]. Około 80% RNA-wirusów spotykanych jest tylko u zwierząt. Często, ich naturalnym rezerwuarem są zwierzęta wolnożyjące. Cechą, która wyróżnia wirusy RNA jest ich zwiększona podatność na mutacje, w wyniku czego adaptują się do nowych gospodarzy, przekraczając w ten sposób barierę gatunkową. Zbliżenie siedlisk ludzi i wielkotowarowych i wysoce wydajnych ferm zwierząt produkcyjnych do terenów zajmowanych przez zwierzęta wolnożyjące, a często ich eliminacja z naturalnych siedlisk wraz ze zmianami w środowisku, zakłócają naturalny ekosystem i sprzyjają wzajemnym kontaktom. Rodzi się w ten sposób niebezpieczeństwo przenoszenia się chorób do nowych gospodarzy. Tak stało się w przypadku grypy wywoływanej przez wirusa grypy A, który z rezerwuaru ptaków wodnych przeniósł się na świnie, drób i konie [22].

Współczesne technologie przyczyniające się do szybkiego transportu i komunikacji, międzynarodowy rynek, zmiany klimatyczne, sprawiają, że Ziemia stała się niewielką przestrzenią, na której lokalne wydarzenia odbijają się w skali globalnej. Dotyczy to w szczególności zdrowia i chorób, które w erze globalizacji, ze względu na szybkie i masowe rozprzestrzenianie się zagrażają wszystkim [38]. Aby zatem zrozumieć współzależności na styku składowych ekosystemu, jak również aby wypracować skuteczne metody zapobiegania chorobom, konieczne jest postrzeganie zdrowia ludzi i zwierząt jako zdrowia jednego ekosystemu. Do realizacji tej idei niezbędna jest międzynarodowa współpraca osób i instytucji reprezentujących wiele specjalności i dyscyplin naukowych, jak lekarzy medycyny i lekarzy weterynarii, mikrobiologów, ekologów, specjalistów z zakresu ochrony środowiska, znawców życia zwierząt wolnożyjących, ale również przedstawicieli nauk ekonomicznych, społecznych, czy polityków [13].

2. Jedna medycyna od starożytności do XVIII w.

Relacje pomiędzy światem zwierząt i ludzi, intrygowały od zawsze i przewijały się w wielu nurtach religijnych i filozoficznych, kierunkach badawczych, zarówno w starożytności, jak i czasach nowożytnych. Obserwacje nad powiązaniem funkcji z analogicznymi strukturami, od początku wskazywały na wspólne mechanizmy regulujące procesy życiowe u jednych i drugich oraz wspólny plan reprodukcji. Ich zakłócenie zwiastowało zaś chorobę. Dowody na przenoszenie obserwacji poczynionych na sekcjonowanych zwierzętach na człowieka pochodzą między innymi z prac greckiego filozofa z IV wieku przed naszą erą, Hipokratesa [8]. Wyróżniając człowieka, jako byt obdarzony duszą, dostrzegał jednak wiele podobieństw między nim, a zwierzętami. Podkreślał również różnice między tymi światami, próbując na tej podstawie stworzyć system taksonomiczny. Pojawianie się epidemii chorób wiązał ze zmianami w środowisku. Podobnie 2 wieki później, Galen, również znany grecki medyk pracujący w Rzymie, ze względu na tabu zakazujące używania do badań ciał ludzkich, wiedzę na temat budowy człowieka czerpał z sekcji przeprowadzanych na zwierzętach [8]. Na jedność medycyny w odniesieniu do ludzi i zwierząt wskazują również późniejsze prace, między innymi Andreasa Wesaliusza (XVI w.) dokonującego na Uniwersytecie w Padwie wiwisekcji zwierząt równolegle z sekcją człowieka, w celu zaobserwowanie różnic pomiędzy żywym i martwym organizmem, jak również wyjaśnienia funkcjonowania poszczególnych narządów [19]. Idea wiwisekcji, choć brutalna w swej istocie, podejmowana była przez innych medyków i przyniosła przełomowe odkrycia w medycynie, jak np. płucne krążenie krwi, funkcjonowanie zastawek żylnych itp. Czerpanie wiedzy medycznej z sekcjonowania zwierząt było w XVI i na przełomie XVII w. powszechną praktyką i skutkowało narodzinami nowej dyscypliny, tj. anatomii porównawczej [11]. Obowiązującą do XVIII w. doktryną w medycynie był humoralizm, zrodzony na podstawie idei głoszonych przez Hipokratesa i Galena, zakładający istnienie 4 płynów ustrojowych, których równowaga zależała od odżywiania się, klimatu, czystości powietrza, wysiłku, czy seksualnych obyczajów. Choroba była skutkiem zakłócenia równowagi pomiędzy wspomnianymi płynami. Żywe były również założenia Hipokratesa na temat wybuchu epidemii, jako skutku zaburzeń w środowisku. Ówcześni medycy i różnego rodzaju uzdrowiciele, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt stosowali zabiegi mające na celu przywrócenie zakłóconej równowagi, poprzez np. upuszczanie krwi, lewatywy, czy zmianę sposobu i miejsca życia [8]. Powszechne również było samoleczenie, leczenie przez duchownych, szlachtę i samozwańczych uzdrowicieli, czy kowali, przyczyniające się do zacierania róż-

nic pomiędzy patrzeniem na choroby ludzi i zwierząt i podejścia do ich leczenia. Ukoronowaniem idei biologicznej wspólnoty ludzi i zwierząt było zaklasyfikowanie przez Karola Linneusza (1707–1778) ludzi, małp człekokształtnych, małp i nietoperzy do rzędu naczelnych oraz orangutanów i ludzi do rodzaju *Homo* [35]. W tym też czasie dochodzi do narodzin porównawczej medycyny, opartej na przenoszeniu wiedzy anatomicznej, obserwacji klinicznych i metod leczenia ze zwierząt na ludzi lub z ludzi na zwierzęta. Jako przykład można przytoczyć wykorzystanie wiedzy i doświadczenia w zwalczaniu dżumy u ludzi do zapobiegania masowym upadkom bydła z powodu choroby znanej współcześnie jako księgosusz. Pionierem takiego postępowania był francuski lekarz, członek Akademii Nauk, Vicq d'Azyr (1746–1794), wywodzący się ze szkoły anatomów porównawczych, który zaproponował zapobieganie księgosuszowi poprzez stosowanie kwarantanny, powszechnie wykorzystywanej w profilaktyce dżumy. Uważał, że medycyna jest jedna i obejmuje w takim samym stopniu ludzi, jak i zwierzęta. Argumentował to podobieństwami w przebiegu chorób, z niewielkimi tylko różnicami u ludzi i zwierząt. W swoich badaniach na temat przyczyn epidemii i epizootii podkreślał rolę środowiska, w tym zmian klimatycznych i położenia geograficznego [20]. Postrzeganie medycyny jako jednej i wspólnej dla ludzi i zwierząt było powszechne również w innych krajach XVIII-wiecznej Europy, szczególnie w drugiej połowie tego wieku. W Anglii powstają pierwsze szpitale dla koni, a konwencjonalna medycyna (*physic*) nie różni się w praktykowaniu na koniach i ludziach. Czołowym anatomem porównawczym jest John Hunter (1728–1793). Jego wychowankiem zaś Edward Jenner (1749–1823), który wykazał później, że inokulacja ludzi materiałem pochodzącym ze zmian wywołanych krowianką chroni przed zachorowaniem na ospę prawdziwą [6, 46].

3. Wyodrębnianie się medycyny weterynaryjnej

Postrzeganie chorób u zwierząt i ludzi od czasów starożytnych do drugiej połowy XVIII w. można założyć, że było takie samo. Praktyki medyczne były sprawowane przez te same osoby w odniesieniu zarówno do ludzi, jak i zwierząt, czerpiących wiedzę z zakresu anatomii, funkcji poszczególnych organów i zmian chorobowych, głównie z sekcji i wiwisekcji przeprowadzanych na zwierzętach i wykorzystywanej następnie do leczenia ludzi. Można więc powiedzieć, że była to era jednej medycyny [8, 46]. Druga połowa XVIII w. zaowocowała powstaniem szkół weterynaryjnych, pierwszej we Francji w Lionie w 1762 r. założonej przez Clouda Bourgelata i kolejnych w Alfort w 1777 r. oraz innych krajach i miastach europejskich, jak w Niemczech w Dreźnie, Freiburgu, Karlsruhe, Berlinie, Monachium, we Włoszech w Turynie, Padwie i Parmie, a także w Wiedniu, Budapeszcie, Kopenhadze, czy Londynie [12]. W Warszawie, dekretem Cara Aleksandra I z 1816 r. powołano w 1824 r. w Instytucie Agronomicznym w Marymoncie, szkołę weterynaryjną pod nazwą „Instytut rządowy Weterynaryi w Burakowie pod Warszawą". W 1823 roku Ludwik Henryk Bojanus założył Szkołę Weterynaryjną przy Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Wileńskiego. We Lwowie Szkołę Weterynarii utworzono w 1881 r., przekształconą następnie w 1898 r. w Akademię Weterynaryjną [7, 23, 42]. Powstanie szkół weterynaryjnych, w historii jednej medycyny stanowi ten moment, w którym dochodzi do zerwania ze wspólną medycyny ludzi zwierząt i początkiem rozwoju bardziej światłej medycyny weterynaryjnej ukierunkowanej na zwierzęta. Należy jednakże podkreślić, że zapoczątkowane zmiany w znakomitej większości były inspirowane w gruncie rzeczy przez samych medyków, którzy w dalszym ciągu zajmowali się leczeniem jednych i drugich, jak również stanowili kadrę powstających szkół weterynaryjnych. Co więcej, w dalszym ciągu i bardziej intensywnie wykorzystywali zwierzęta do badań naukowych, w tym również do wiwisekcji [8, 46]. Obserwacje dokonywane przez Francois Magendie (1783–1855) podczas wiwisekcji koni przyczyniły do rozwoju eksperymentalnej fizjologii [15]. Wspomniany wcześniej Vicq d'Azyr w szkole weterynaryjnej w Alfort utworzył katedrę anatomii porównawczej w ramach, której przyszli weterynarze studiowali również chirurgię i położnictwo człowieka, tak aby móc świadczyć usługi z tego zakresu w środowisku wiejskim [20]. Podobne podejście do kształcenia weterynarzy, często prowadzonego w szkołach medycznych było również praktykowane w innych krajach. Taki model kształcenia sprzyjał współpracy pomiędzy medykami i weterynarzami, która skutkowała wymianą wiedzy na temat przyczyn, natury choroby, w tym analogii do człowieka, jej przebiegu, czy zmian sekcyjnych. Medycy nie rzadko asystowali weterynarzom w ich dochodzeniach mających na celu poznanie przyczyn choroby. Rozwijająca się współpraca pomiędzy reprezentantami wyodrębniających się pomimo tego zawodów, w gruncie rzeczy sprzyjała poznaniu istoty i związku chorób dotykających zarówno ludzi, jak i zwierząt. Medyczne zainteresowania chorobami zwierząt przyczyniły się w połowie XIX w. do powiązania nosacizny u koni, wścieklizny u psów, czy wąglika u przeżuwaczy z analogicznymi chorobami u ludzi [44]. Anatomia porównawcza dostarczyła dowodów, że ludzie i zwierzęta są zbudowani według podobnego, ogólnego planu, co sugeruje ich anatomiczną i funkcjonalną jedność, jak również tłumaczy podatność na choroby i ich przebieg. Rudolf Carl Virchow (1821–1902) niemiecki lekarz, anatomopatolog, wyznający zasadę,

że choroba jest skutkiem zaburzenia wewnętrznej struktury ciała, głosił, że „...nie ma linii podziału pomiędzy medycyną ludzi i zwierząt i jej być nie powinno" [36]. Były to więc czasy, w których nie różnicowano tej dyscypliny wiedzy i profesji zakorzenionej mocno w świadomości ówczesnych medyków i społeczeństw, do których sięga dzisiejsza idea jednego zdrowia „One Health".

Równolegle, w wyniku działalności szkół weterynaryjnych powstawała coraz liczniejsza grupa wykształconych weterynarzy, którzy przejmowali opiekę medyczną nad zwierzętami, jak również stanowili kadrę nauczającą. Kształtował się zatem wyraźnie wyodrębniający się zawód lekarza weterynarii. Dodatkowo, reformy dokonywane w szkołach medycznych ograniczały zakres ich zainteresowania tylko do ludzi. Przybywało także przeciwników wiwisekcji. Tak więc w historii rozwoju medycyny, ostatecznie w drugiej połowie XIX w. dokonał się jej instytucjonalny podział na część stricte medyczną i odrębną weterynaryjną [8, 46].

Ważne dla nauki wydarzenia, które miały miejsce w drugiej połowie XIX wieku, jak opublikowanie przez Karola Darwina przełomowego dla teorii ewolucji dzieła „O pochodzeniu gatunków", odkrycie przez Ilję Miecznikowa zjawiska fagocytozy, obalenie przez Ludwika Pasteur'a teorii samorództwa, czy wreszcie udowodnienie przez Roberta Kocha etiologicznej roli bakterii w wywoływaniu chorób zakaźnych potwierdzały ewolucyjną jedność zwierząt i ludzi. Wskazały również na wspólne mechanizmy obronne i etiopatogenezę chorób. Z różnym skutkiem jednak wpływały na kształtowanie się idei jednego zdrowia. Etiologiczne związki chorób ludzi i zwierząt przyczyniły się do wyodrębnienia ich nowej kategorii, tj. zoonoz, stanowiących odzwierzęce zagrożenie dla ludzi [21, 44]. Z tego tytułu, wpłynęło na bliższe powiazanie weterynarii i medycyny poprzez wspólne działania w obszarze zdrowia publicznego. Z drugiej strony, bakteryjna teoria chorób zakładała prosty związek przyczynowo skutkowy pomiędzy określonym drobnoustrojem, a zwierzęciem, czy człowiekiem. Marginalizowała znaczenie środowiska, traktowanego wcześniej jako ważny czynnik wpływający na rozwój choroby, czy tez zachowania zdrowia.

W obszarze zdrowia publicznego zaczyna się konkurencja pomiędzy lekarzami medycyny i lekarzami weterynarii z chęcią dominacji tych pierwszych, dla których priorytetem staje się zdrowie ludzi. Lekarze weterynarii koncentrują się na zwierzętach i gospodarce rolnej. Pozostaje jednak dla jednych i drugich wspólny obszar medycyny i zdrowia budzący niestety spory kompetencyjne, jak np. nadzór i kontrola nad zagrożeniami płynącymi ze strony produktów zwierzęcych, jak mleka, czy mięsa. Do tego dochodziły również spory co do zasad regulujących obrót produktami pochodzenia zwierzęcego, czy też definicji zdrowego zwierzęcia. Przyczyniało się to do strukturalnego i politycznego rozdziału tych wspólnych wcześniej części jednej medycyny do różnych admiracyjnych agend rządowych. Pod koniec XIX wieku, w obszarze zdrowia publicznego, w zależności od kraju, nadzór weterynaryjny dotyczył obrotu mięsa i mleka, w tym rzeźni, dostaw mleka itp. Oczywiście, opisana sytuacja nie sprzyjała rozwijaniu idei jednego zdrowia [27].

4. Mikrobiologia w medycynie weterynaryjnej

Na tle przedstawionego powyżej przeglądu literatury na temat rozwoju medycyny człowieka i medycyny weterynaryjnej można powiedzieć, że podobnie było z narodzinami i różnicowaniem się mikrobiologii, początkowo jednej, zorientowanej głównie na czynniki wywołujące choroby u ludzi i zwierząt. Jako nauka narodziła się stosunkowo późno, bo dopiero w początkach drugiej połowy XIX w., kiedy to przy pomocy naukowych metod udało się rozwiązać fundamentalne dla tej dyscypliny kwestie, jakimi było obalenie przez Ludwika Pasteur'a teorii samorództwa (1861) oraz udowodnienie przez Roberta Kocha bakteryjnej etiologii chorób zakaźnych (1884) [4–6, 32]. Dane na temat mikrobów, jako potencjalnych czynników chorób zwierząt przedstawiane były wcześniej, między innymi przez Erica Viborga (1759–1822) duńskiego lekarza weterynarii i botanika. Viborg studiowała nauki weterynaryjne w Szkole Weterynaryjnej w Kopenhadze, w której później wykładał, a nawet został rektorem. Był też szefem katedry botaniki na uniwersytecie kopenhaskim. W swoich badaniach naukowych nad nosacizną u koni wykazał, że jest to choroba zakaźna, którą można przenieść na inne konie poprzez ropną wydzielinę. Czynnik zakaźny (obecnie *Burkholderia mallei*) okazał się wrażliwy na podwyższoną temperaturę i wysychanie [28]. Wczesne badania nad etiologią wąglika prowadzone były w głównej mierze przez praktykujących lekarzy weterynarii. Während Eilert w 1836 r. oraz von Gerlach w 1845 r. przeprowadzili szereg doświadczeń, z których wynikało, że wąglik jest chorobą, którą można było przenieść. Gerlach rozpoznał, że *pustula maligna* jest formą kliniczną wspomnianej choroby, a zmiany patologiczne występujące u owiec i wołów są skutkiem tej samej choroby. Czynnik zakaźny zaś przeżywa w ziemi w miejscach grzebania padłych zwierząt. Podobne obserwacje znajdujemy w opisach francuskich lekarzy, Pierrea F. Rayera i Casimira Davaina z 1850 r. oraz niemieckiego lekarza Aloysa Pollendera z 1855 r., którzy obserwowali nienazwane jeszcze wtedy bakterie wąglika, we krwi chorych i padłych zwierząt. Davaine w 1863 r., a więc wcześniej niż R. Koch odtworzył wąglik u bydła poprzez wstrzyknięcie krwi zawierającej bakterie zdrowym zwierzętom [45]. Wiek XIX, a szcze-

gólnie jego druga połowa, określany jest złotym wiekiem mikrobiologii i każdy niemalże dzień przynosił odkrycie nowych bakterii, szczepionek i metod szczepienia, seroterapii itp. Często, w krótkim odstępie czasu, różni badacze izolowali, opisywali i odmiennie nazywali te same drobnoustroje. Wykaz wybranych bakterii i odkryć specyficznych dla mikrobiologii weterynaryjnej na przełomie XIX i XX w. przedstawiono w Tab. I.

Pod koniec XIX wieku, bazując na wiedzy wypływającej z bakteryjnej teorii chorób i etiologicznego związku pomiędzy czynnikiem zakaźnym i chorobą, rozwija się immunologia. Jej podwaliny tworzy Ludwik Pasteur, który w wyniku atenuacji zjadliwych czynników zakaźnych konstruuje szczepionki. Pierwsze sukcesy wynikające z zastosowania atenuowanych szczepionek wzbudzają niezwykły optymizm i nadzieję na zapobieganie i leczenie wszystkich chorób zakaźnych. Najsilniej prace Pasteura wspierali lekarze weterynarii i natychmiast wdrażali je do praktyki, wprowadzając szczepienia przeciwko cholerze drobiu, różycy świń, wąglikowi przeżuwaczy, wściekliźnie u psów itp. W pracy nad szczepionką przeciwko wąglikowi Pasteur wykorzystał ideę atenuacji bakterii przy pomocy związków chemicznych (kwasu karbolowego) opisanej przez Josepha Henriego Toussainta (1847–1890) profesora w Szkole Medycyny Weterynaryjnej w Tuluzie, prowadzącego również badania nad szczepionkami dla zwierząt. Pasteur do stworzenia swojej szczepionki zastosował atenuacje laseczek wąglika przy pomocy dwuchromianu potasu [28, 45].

Po odkryciu przez Emila von Behringa i Shibasaburo Kitasato (1890), że podanie zwierzętom toksyny błoniczej skutkuje specyficzną neutralizacją przez surowice tych zwierząt toksyny natywnej, nastała era seroterapii. Gaston Ramon (1886–1963), absolwent szkoły weterynaryjnej w Alfort odkrył z kolei, że potraktowanie toksyny błoniczej i tężcowej formaldehydem inaktywuje jej biologiczne właściwości, ale zachowuje zdolności do wytwarzania przeciwciał. Uzyskał więc toksoid niezwykle przydatny do produkcji szczepionek i surowic odpornościowych również współcześnie. Szczepienia zwierząt i ludzi zyskały aprobatę w całej Europie i Świecie. Masowo zaczęto produkować również surowice odpornościowe w wyniku immunizacji zwierząt, wykorzystywane do leczenia i profilaktyki wielu chorób, jak np. u zwierząt różycy, tężca, zgorzeli gazowej, choroby czarnej nogi itp. [28, 43]. W Polsce inicjatorem sczepień i seroterapii zarówno dla zwierząt, jak i ludzi był Odo Feliks Kazimierz Bujwid (1857–1942) [9, 32].

Po określeniu przez R. Kocha cech tuberkuliny i wykryciu, że po jej wstrzyknięciu osobom chorym na gruźlicę wywołuję reakcję alergiczną (1890), ta cecha wspomnianej substancji została wykorzystane przez Woldemara Gutmanna, lekarza weterynarii i profesora szkoły weterynaryjnej w Dorpat (Tartu) do diagnozowania gruźlicy u bydła. Niemalże równolegle (1891) Christophor Ivanovitsch Helman i Otto Ivanowitsch Kalning otrzymują malleinę w wyniku wodnej i glicerolowej ekstarcji, zabitej poprzez gotowanie, hodowli pałeczek nosacizny. Otworzyło to drogę do rozwijania, podobnie, jak w przypadku bydła, przyżyciowej diagnostyki nosacizny u koni i innych jednokopytnych. W tym też okresie dochodzi do rozwoju serologicznych testów diagnostycznych, jak precypitacji, aglutynacji, odczynu wiązania dopełniacza itp. [28].

Mikrobiologia jest dyscypliną mocno zakotwiczoną w nauce medycznej i weterynaryjnej. Odgrywa czołową rolę w medycynie prewencyjnej, diagnostyce i lecznictwie chorób, epidemiologii, ma zastosowanie w chirurgii i szeroko rozumianej higienie, w tym higienie żywności. Zyskuje na znaczeniu nie tylko, jako interesująca i dynamicznie rozwijająca się dyscyplina naukowa, ale również, jako nauka przynosząca wymierne korzyści ekonomiczne.

Cechą mikrobiologii XX wielu jest poszerzanie pola zainteresowań obejmującego mniejsze formy życia, jak rickettsie, czy wirusy. Co prawda Friederich Löffler i Paul Frosch, jeszcze pod konie XIX w., wykazali że czynnik etiologiczny pryszczycy przechodzi przez filtr przeciwbakteryjny, jednakże dopiero odkrycie przez Fredericka Tworta bakteriofagów (1915) otworzyło pole badań nad wirusami [45]. Mikrobiologia się specjalizuje, powstają jej wąskie odgałęzienia, jak fizjologia mikroorganizmów będąca podstawą narodzin biochemii porównawczej, taksonomia, mikrobiologia ekologiczna przynosząca odkrycie nowych antybiotyków, genetyka mikroorganizmów i szereg innych, często o bardzo praktycznych zastosowaniach [43]. Podobnie jednak, jak medycyna stanęła przed wyzwaniami wynikłymi z pojawienia się nowych i powracających chorób. Z powyższym wiąże się właściwe i bezpieczne pobieranie próbek, również środowiskowych oraz szybka i dokładna diagnostyka, niezbędna do podjęcia działań zapobiegawczych i zwalczających [22]. Drugim wyzwaniem dla współczesnej mikrobiologii jest narastająca oporności bakterii na znane antybiotyki. W tych dwóch, co najmniej aspektach jako nauka wywodząca się z nauk medycznych włącza się w realizację idei jednego zdrowia, zarówno w sferze kadrowej, jak i instytucjonalnej, krajowej i międzynarodowej [17]. W sferze kadrowej, zauważa się widoczny brak specjalistów z zakresu chorób zakaźnych zdolnych kompleksowo powiązać symptomy pojawiającego się zjawiska, bez względu na to, czy dotyczy ono zwierząt, czy ludzi. Wzrastająca instytucjonalna separacja w zarządzaniu zdrowiem jednych i drugich również nie sprzyja współpracy w szybkim rozpoznaniu nowych chorób i im przeciwdziałania. Przykładem, który ilustruje opisany stan rzeczy była epidemia gorączki Zachodniego Nilu w 1999 r. w Nowym Jorku, przedłużająca

Tabela I
Wybrane osiągnięcia i odkrycia z zakresu mikrobiologii weterynaryjnej na przełomie XIX i XX w.

Lp.	Rok	Drobnoustrój / choroba	Odkrywca	Uwagi
1.	1877	*Bacillis anthracis* / wąglik	Wiele opisów choroby i samych bakterii. Robert Heinrich Hermann Koch udowodnił etiologiczny związek pomiędzy bakteriami i chorobą.	R. Koch ukończył studia medyczne na Uniwersytecie w Getyndze. W ich trakcie wykonywał badania pod kierunkiem Jakoba Henlego. Był lekarzem praktykującym w Wolsztynie, profesorem Uniwersytetu Berlińskiego, dyrektorem Pruskiego Instytutu Chorób Zakaźnych.
2.	1877	*Actinomyces bovis* / promienica bydła	Opisany przez Otto Bollingera[1], nazwany przez Carla Otto Harza	[1] Pracował w Wyższej Szkole Weterynaryjnej w Zurychu a następnie w Monachium
3.	1880	*Pasteurella multocida* / pasterelozy, cholera drobiu	Louis Pasteur ukończył École Normale Supérieure w Paryżu. Profesor fizyki w Dijon Lycée oraz chemii na uniwersytecie w Strasburgu, dyrektor naukowy w École Normale Supérieure, Kierownik katedry chemii organicznej na Sorbonie, twórca Instytutu Pasteura (1887).	Szczep do przygotowania szczepionki otrzymał od Jean Joseph Henri Toussainta, lek.wet., który ukończył Szkołę Medycyny Weterynaryjnej w Lionie, był profesorem anatomii, fizjologii i zoologii w Szkole Medycyny Weterynaryjnej w Tuluzie. Pasteur przygotowując szczepionkę przeciwko wąglikowi wzorował się na pracach Toussainta.
4.	1885	*Erysipelothrix rhusiopathiae* / różyca świń i indyków	Friederich August Johannes Löffler, (niezależnie Pasteur i Thuillier)	Studia medyczne ukończył na uniwersytecie w Berlinie, współpracował z R. Kochem (1879–1884). (Antoni Spryszak i Zygmunt Szymanowski 1929 r. wykazali, że komórki *Erysipelothrix* i *Listeria* występują w formie szorstkiej i gładkiej, tworząc odrębne kolonie).
5.		*Salmonella choleraesuis* / cholera świń	Theobald Smith[1] i Daniel Elmer Salmon[2]	[1] Studia medyczne odbył w Albany Medical College, od 1883 r. pracował w USDA. [2] Był lekarzem wet., prowadził badania nad chorobami zakaźnymi u zwierząt w U.S. Department of Agriculture.
6.	1887	*Clostridium chauvoei* / choroba czarnej nogi u bydła, szelestnica	Saturnin Arloing[1], Charles Cornevin[2], Onésine Thomas	[1] Lek. wet. profesor anatomii i fizjologii, [2] Profesor szkoły weterynaryjnej w Lionie.
7.	1887	*Streptococcus agalactiae* / zapalenie wymienia (mastitis)	Edmond Isidore Étienne Nocard* i H. Mollereau	* Studia weterynaryjne ukończył w École Vétérinaire de Maisons-Alfort w której później pracował. Współpracował z L.Pasteurem i Emilem Rouxem. Jego wychowankiem był Camille Guérin.
8.	1888	*Nocardia farcinica* / nokardioza bydła	Edmond Isidore Étienne Nocard	Vittore Benedetto Trevisan zaproponował nazwanie rodzaju bakterii imieniem odkrywcy
9.	1888	*Vibrio metchnikovii* / wibrioza drobiu	Nikolai Fedorovich Gamaléia	Pracował w Odessie. W przewodzie pokarmowym i krwi ptaków z objawami przypominającymi cholerę drobiu stwierdził przecinkowce.
10.	1892	Pierwsi dostarczyli dowodu, że czynnik etiologiczny pryszczycy przechodzi przez filtr przeciwbakteryjny	Friederich August Johannes Löffler i Paul Frosch*	* Pionier wirusologii weterynaryjnej, profesor w Instytucie Chorób Zakaźnych w Berlinie oraz Szkole weterynaryjnej w Berlinie
11.	1892	Teoria przenoszenia chorób przez wektory na zwierzęta i ludzi.	Frederick Cooper Curtice	Pierwszy amerykański narodowy parazytolog weterynaryjny.
12.	1893	*Babesia bigemina* / gorączka teksańska, babeszjoza bydła. Pierwsi wykazali przenoszenie chorób przez kleszcze.	Theobald Smith, Fred Lucius Kilborne[1], Frederick Cooper Curtice[2]	[1]Ukończył studia weterynaryjne na Uniwersytecie Cornell, był Dyrektorem Buireau of Animal Industry w Waszyngtonie. [2]Stopień lekarza weterynarii uzyskał w Columbia Veterinary College w Nowym Jorku.
13.	1895	*Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* / paratuberkuloza bydła, choroba Johnego	Heinrich Albert Johne* i L. Frothingham	*Lek. wet. pracował w Weterynaryjnym Zakładzie Patologii w Dreźnie.
14.	1897	*Brucella abortus* / brucelloza bydła	Bernhard Lauritz Frederik Bang	Lek. wet., profesor Królewskiego Uniwersytetu Weterynaryjnego i Rolniczego w Kopenhadze, późniejszy jego dyrektor.

Tabela I. c.d.

Lp.	Rok	Drobnoustrój / choroba	Odkrywca	Uwagi
15.	1898	*Mycoplasma* / pleuropneumonia bydła. Badania prowadzono nad mikroorganizmami wywołującymi pleuropneumonię (pleuropneumonia-like organism – PPLO), trudno jednoznacznie wskazać gatunek.	Edmond Isidore Étienne Nocard i Emile Roux. Ten ostatni ukończył Szkołę medyczną w Clermont-Ferrand, w latach 1878–1880 współpracował z Pasteurem, między innymi w badaniach nad cholerą u drobiu i przygotowaniu szczepionki przeciwko tej chorobie.	Julian Ignacy Nowak (*Mycoplasma* Nowak 1929), Wróblewski W. (1931), opisali elementarne cienkie formy charakteryzujące się dużą plastycznością, które pokonywały przeciwbakteryjne filtry. Wróblewski, wyizolował i opisał *Mycoplasma agalactiae*.
16.	1902	*Actinobacillus lignieresi* / choroba drewnianego języka, actinobaciloza bydła	Joseph Léon Marcel Ligniéres*, G. Spitz	* Argentyński lekarz weterynarii i bakteriolog, urodzony we Francji.
17.	1909	Uzyskali awirulentny szczep prątka bydlęcego – BCG (Bacille-Calmette-Guérin), powszechnie wykorzystywany do szczepienia bydła i ludzi przeciwko gruźlicy	Léon Charles Albert Calmette, Jean-Marie Camille Guérin*, Benjamin Weill-Hallé, Alfred Bouquet, Leopold Nègre, Wilbert, Marcel Léger i Raymond Turpin	*Ukończył studia weterynaryjne w Alfort. Pracował w instytucie Pasteura w Lille. Pełnił funkcję Prezydenta Narodowego Komitetu Obrony przed Gruźlicą, Prezydenta Francuskiej Akademii Weterynaryjnej i Medycznej.

się z powodu braku właściwego rozpoznania. Upadki ptaków w Zoo w Bronxie, jak również upadki ptaków w mieście nikt nie był w stanie powiązać z podwyższoną liczbą zaburzeń neurologicznych stwierdzanych u ludzi, jak się później okazało, spowodowanych przez ten sam czynnik etiologiczny. Podobnie, trzymanie się przestarzałych protokołów diagnostycznych podczas epizootii pryszczycy w 2001 r. w Wielkiej Brytanii przyczyniło się do opóźnienia w rozpoznaniu tej choroby [18, 22]. Przytoczone przykłady pokazują, że mikrobiologia medyczna i mikrobiologia weterynaryjna ewaluują w kierunku wykształcenia nowego pokolenia specjalistów znających doskonale nie tylko nowe techniki diagnostyczne, ale dysponujących również wiedzą z zakresu patogenezy chorób, rezerwuaru patogenów, czy podstawowych zasad sprawowania kontroli nad nieznanymi chorobami. Oczekuje się również od nich umiejętności w formułowania pytań i wyciągania wniosków w przypadkach zaobserwowania niejasnych i zaskakujących zjawisk, zarówno w odniesieniu do praktyki klinicznej, jak i dotykających zwierzęta hodowlane, czy wolnożyjące. Do tego należy dodać umiejętności pobierania materiału i wykonanie badań w kierunku patogenów 4 klasy. Tak więc mikrobiologia, jako nauka o rodowodzie medycznym siłą rzeczy pozostaje dyscypliną wykorzystywaną do realizacji idei jednego zdrowia.

5. Idea jednego zdrowia w medycynie XX-wiecznej

XX wiek charakteryzuje się zauważalną dwuznacznością w ocenie przyczyn i przebiegu choroby, czy też zachowania zdrowia u zwierząt i ludzi. Wynikało to po części z XIX-wiecznych osiągnięć nauk biologicznych, w tym badań na temat ewolucji. Na podstawie danych z zakresu filogenezy zaczęto dostrzegać znaczące różnice pomiędzy samymi zwierzętami, jak i nimi oraz ludźmi. Przenoszenie więc w całości wiedzy na temat etiologii i patogenezy chorób u zwierząt na człowieka mogło się okazać złudne. Na procesy chorobowe u różnych zwierząt i człowieka należałoby raczej patrzeć pod kątem ich analogii, a nie identyczności. Postępująca urbanizacja i miejski styl życia wyeliminowały zwierzęta z miast. Zmuszało to do utrzymywania zwierząt w instytucjach badawczych, co z czasem doprowadziło do masowej hodowli standaryzowanych zwierząt laboratoryjnych. Zwierzętom takim nadawano pożądane cechy genetyczne, przydatne np. do badań nad nowotworami, odpornością immunologiczną, transplantologią, standaryzacją leków itp. Szczególne nasilenie w wykorzystywaniu zwierząt laboratoryjnych w badaniach medycznych obserwuje się w drugiej połowie XX wieku. Tak więc zwierzęta z towarzyszących człowiekowi stały się ekwiwalentnymi modelami do badań nad funkcjonowaniem i modelowaniem organizmu człowieka [29]. Przestawienie się nauk medycznych na masowe wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych o ściśle określonych cechach wpłynęło również na włączenie się w procedury eksperymentowania lekarzy weterynarii, którzy potrafili tak je poprowadzić, aby uzyskać maksimum zakładanych efektów, przy minimalizowaniu liczby i dyskomfortu zwierząt. Jest to w jakimś stopniu powrót do idei z połowy XIX w. współpracy lekarzy medycyny i lekarzy weterynarii w ramach jednej medycyny [26]. Równolegle podejmowane są działania, które mają na celu dalsze podtrzymanie i rozwijanie idei medycyny porównawczej, między innymi poprzez wprowadzenie do programów kształcenia w szkołach medycznych i weterynaryjnych zagadnień z zakresu

medycyny porównawczej, w tym doboru modelowych zwierząt do badań nad określonymi chorobami [34]. Początkowo, dane z badań porównawczych wykorzystywane były do diagnozowania i leczenia chorób sercowo-naczyniowych i nowotworowych, a z początkiem lat 60. XX w. również w innych obszarach medycyny, jak badaniach wirusologicznych, neuropatologicznych, czy badaniach nad mykoplazmami [8, 25].

Odtwarzanie choroby, czy też badanie określonego procesu na dobranym modelu zwierzęcym miało także swoich przeciwników. Ci argumentowali, że co prawda medycyna porównawcza ze względu na fakt, że obejmuje wiele gatunków zwierząt jest w stanie dostarczyć więcej danych na temat wielorakich chorób, to jednakże uzyskane informacje należy zawęzić do pewnych cech wspólnych dla danego zjawiska. Do oceny specyficznego procesu niezbędna jest szersza wiedza na temat podobieństw i różnić wynikających z odmienności gatunkowej zwierząt wykorzystywanych do badań. Taką wiedzę de facto posiadają lekarze weterynarii i chociażby z tego powodu powinni być cennymi partnerami w eksperymentowaniu na zwierzętach [3]. W powyższym spojrzeniu na wykorzystywanie do celów medycznych danych z doświadczeń na zwierzętach przejawia się powrót do źródeł, do idei jednej medycyny, reprezentowanej przez obydwa zawody, wspólnych badań i wspólnego kształcenia, szczególnie podyplomowego. Ideę te wspiera szereg instytucji naukowych i edukacyjnych na całym świecie. Do czołowych należy Instytut Rockefeller'a, w którym zorganizowano nauczanie patologii zwierząt, aby na tej podstawie, podejmować przyszłe badania medyczne, opracowywać programy naukowe, czy zdrowotne [10]. Pierwszym dyrektorem Department of Animal Pathology we wspomnianym instytucie zostaje w roku 1915 Theobald Smith, lekarz medycyny, który wyznaje zasadę, że znajomość patologii zwierząt, powinna być podstawą całej medycyny. We wcześniejszych swoich badaniach nad gorączką teksańską u bydła (obecnie babeszjoza bydła) zastosował bardziej kompleksowe charakterystyczne dla medycyny porównawczej podejście do wyjaśnienia jej przyczyn z uwzględnieniem oddziaływań środowiska. Dzięki temu udało Mu się wykazać związek pomiędzy inwazją kleszczy u bydła a rozwojem choroby. Wraz z Frederickiem L. Killbornem udowodnili przenoszenie pierwotniaków *Pyrosoma bigeminum*, czynników etiologicznych choroby (obecnie należących do rodzaju *Babesia*) przez pajęczaki *Boophilus annulatus* [14]. Ideę ten kontynuował Jego następca Richard E. Shope odkrywca wirusa grypy świń. Badacz ten wyjaśnił znaczenie wspomnianego wirusa w wywoływaniu grypy u ludzi. Z kolei badania Peyton'a Rous'a we współpracy z Shopem na kurczętach i królikach doprowadziły do odkrycia wirusowej etiologii raka (*sarcoma*) [39]. W Wielkiej Brytanii program badawczy w Medical Research Concil nad nosówką u psów przyczynił się do odkrycia w 1933 r. wirusa grypy [8].

W okresie powojennym świat zmagał się z wieloma problemami wynikającymi ze zniszczeń wojennych, zapaści gospodarczej i podziałów politycznych, przekładających się również na zdrowie. W tym kontekście, w 1948 r. pojawia się ze strony Jamesa H. Steelea (1913–2013) inicjatywa utworzenia w ramach World Health Organization (WHO) jednostki Weterynaryjnego Zdrowia Publicznego (Veterinary Public Health – VPH). Steele był lekarzem weterynarii, wykształconym również w zakresie zdrowia publicznego, późniejszym orędownikiem idei jednej medycyny. Wywodził się ze szkoły znakomitego szwedzko-amerykańskiego patologa weterynaryjnego Karla F. Mayera (1844–1974), nazywanego Pasteurem XX w., zwolennika integracji medycyny weterynaryjnej i medycyny człowieka, twórcy fundacji Hoopera, światowego ośrodka badań nad zoonozami i bezpieczeństwem żywności. Steele po drugiej wojnie światowej w ramach amerykańskiej służby ochrony zdrowia (US Public Health Service) utworzył weterynaryjną służbę ochrony zdrowia, a także opracował program weterynaryjnej ochrony zdrowia w ramach Centrum Chorób Zakaźnych (Communicable Disease Center) WHO, dotyczący monitorowania zoonoz. Dyrektorem Centrum został Martin Kaplan (1915–2004), lekarz weterynarii i specjalista z zakresu zdrowia publicznego, który nawiązał współpracę z Food and Agriculture Organization (FAO), World Organisation for Animal Health (OIE) w zakresie kontrolowania zoonoz, opracowywania standardów dla higieny mięsa i edukacji weterynaryjnej. FAO i WHO uznając, że zdrowie zwierząt produkcyjnych istotnie rzutuje na zdrowie ludzi ustanowiły lekarzy weterynarii odpowiedzialnymi za obszar zdrowia publicznego związany z chorobami odzwierzęcymi i higieną środków żywnościowych zwierzęcego pochodzenia [24, 41].

W latach 50. i 60. XX w. FAO i WHO wspierały, w tym finansowo, kształcenie weterynaryjne i edukację w zakresie Weterynaryjnego Zdrowia Publiczne w krajach rozwijających się. Uczestniczyli w tym eksperci, głównie pochodzący ze Stanów Zjednoczonych, którzy na poziomie lokalnym i narodowym w okresie powojennym budowali zręby Weterynaryjnego Zdrowia Publicznego. Ideę te na poziomie międzynarodowym realizowało Pan-Amerykańskie biuro zdrowia (Pan-American Health Bureau). Współdziałanie lekarzy medycyny i lekarzy weterynarii w ramach programów pomocowych dedykowanych krajom rozwijających się zbliżało znowu te dwa zawody do idei jednej medycyny. W tym też okresie należałoby szukać korzeni dzisiejszej inicjatywy jednego zdrowia [41].

Wielkim orędownikiem jednej medycyny był Calvin Schwabe, (1927–2006) epidemiolog weterynaryjny, pro-

fesor Davis School of Veterinary Medicine, zwolennik medycyny porównawczej, który użył i upowszechnił termin „One Medicine" w III wydaniu, z 1984 r. swojego dzieła pt. Veterinary Medicine and Human Health [37].

W praktyce, szczególnie widocznej pod koniec lat 70. XX w., zastosowanie medycyny porównawczej w badaniach medycznych było zmienne i często niesatysfakcjonujące. Wynikało to z widocznego rozdziału i niezależnego rozwoju medycyny i weterynarii, realizujących odrębnie badania z zakresu zdrowia ludzi i zwierząt, finansowane przez odmienne instytucje, podległe różnym strukturom administracyjnym, czy też należące do odrębnych organizacji międzynarodowych [8].

Podobnie, znaczenie środowiska dla zdrowia zwierząt i ludzi postrzegane było w zmienny sposób. Przyjęcie, często bezkrytycznie, jednoczynnikowej (bakteryjnej) etiologii chorób odwróciło uwagę od innych czynników, w tym środowiskowych, wpływających na pojawianie się chorób, ich przebieg i rozprzestrzeniania się. Takie spojrzenie było dodatkowo utrwalane efektami zastosowania szczepionek i antybiotyków i prowadziło do przekonania, że choroby zakaźne zostały pokonane i nie stanowią dalszego zagrożenia. Poczynając od lat 80. XX w. wspomniany optymizm został zgaszony pojawieniem się takich chorób, jak AIDS, gorączek krwotocznych, w tym spowodowanych przez wirus Ebola, czy gąbczastych encefalopatii, w tym BSE (Tab. II). Wspomniane wydarzenia ponownie zwróciły uwagę na związek pomiędzy zdrowiem zwierząt i człowieka oraz środowiskiem ich życia. W celu zrozumienia przyczyny choroby, jej powstawania, przebiegu i rozprzestrzenianiu się okazało się, że potrzebna

Tabela II
Ważniejsze epidemie chorób u ludzi spowodowane czynnikami rezerwuaru zwierzęcego

Lp.	Rok/choroba	Czynnik etiologiczny	Rezerwuar	Wektor/sposób zakażenia	Uwagi
1.	1967/gorączka krwotoczna Ebola	*Wirus Ebola* (Zaire Ebolavirus), rodzaj *Ebolawirus*	Nietoperze owocożerne, możliwe inne ssaki, ptaki, gady, płazy,	Kontakt bezpośredni, krew, wydzieliny, wydaliny stawonogi	Epidemia gorączki krwotocznej Ebola w Afryce Zachodniej
2.	Inne gorączki krwotoczne	*Wirus Lassa*, rodzaj *Arenawirus*; grupa *wirusów Hanta*; *wirus Guanarito*	Gryzonie	Kantak bezpośredni, krew, wydzieliny, wydaliny	(Lassa; gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym, hantawirusowy zespół płucny; wenezuelska gorączka krwotoczna
3.	1997 / grypa ptaków	*Influenza A virus*, rodzaj *Influenzavirus A*, rodzina *Orthomyxoviridae*	Ptaki, w tym wolnożyjace	Kontakt bezpośredni	Wysoce patogenny szczep wirusa ptasiej grypy H5N1, przenosi się na człowieka
4.	1997 / choroba Nipah	*Nipah henipavirus*, rodzaj *Henipavirus*, rodzina *Paramyksowiridae*	Nietoperze owocożerne, możliwe świnie jako nosiciel pośredni	Kontakt bezpośredni, produkty żywnościowe zanieczyszczone wydalinami	Wycinka lasów tropikalnych spowodowała zbliżenie się nietoperzy do siedlisk ludzkich
5.	Początek lat 90. epidemia BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy), gąbczastej encefalopatii bydła	priony PrPsc	Bydło, małe przeżuwacze	Spożycie produktów żywnościowych pochodzenia bydlęcego, głownie tkanki nerwowej	U człowieka choroba Creutzfeldta-Jakoba vCDJ
6.	1999/choroba Zachodniego Nilu	1999 *wirus Zachodniego Nilu*, rodzaj *Flawiwirus*, rodzina Flawiwiridae	Ptaki	Komary	Pierwsze zachowania na półkuli zachodniej (epidemia w Nowym Jorku)
7.	1999 i 2003 zachorowania w Hongkongu na grypę	szczep wirusa ptasiej grypy H9N2	Ptaki, drób	Kontakt bezpośredni, woda	Duży wachlarz gospodarzy, adaptuje się do ssaków
8.	2002/zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej (Severe Acute Respiratory Syndrome-SARS)	*wirus SARS*, rodzaj *Koronawirus*	Paguma chińska	Droga kropelkowa, wydaliny, wydzieliny	Zakażenie możliwe u fretek i kotów
9.	2009/Pandemia grypy	szczep wirusa grypy A/H1N1		Kontakt bezpośredni, głownie ze świniami	Tzw. świńska grypa
10.	2012/Bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej (MERS-Midle East Respiratory Syndrome)	Korona *wirus MERS*, rodzaj *Koronawirus*	Wielbłąd jednogarbny	Droga kropelkowa, wydaliny, wydzieliny	Prawdopodobne pierwotne źródło – nietoperze

jest nie tylko wiedza medyczna, czy weterynaryjna, ale również wiedza z zakresu ekologii, entomologii, rolnictwa czy nawet klimatu. W nawiązaniu do ostatniego, wydaje się, że na wybuch epidemii cholery w poszczególnych częściach świata ma wpływ oscylacja południowego frontu El Niño. Śledzenie wspomnianego frontu przez satelity pozwala na przewidywanie wybuchu i natężenia wspomnianej choroby. Dla pełnego obrazu pojawiania się chorób indukowanych zaburzeniami środowiska należy jeszcze dołożyć czynniki ekonomiczne i polityczne [13, 16, 18, 33, 40, 46].

6. Podsumowanie

Z przedstawionego przeglądu piśmiennictwa wynika, że niezależnie od tego, jak w poszczególnych okresach rozwoju medycyny kształtowały się poglądy na temat chorób u ludzi i zwierząt, czy sposobów ich leczenia, historyczne związki pomiędzy zdrowiem ludzi i zwierząt, a także udziałem w ich powstawaniu środowiska nie budziły wątpliwości, były wielorakie i często bardzo ścisłe. Dane na ten temat znajdujemy w doktrynach badawczych i praktyce lekarskiej, które odzwierciedlają drogę, na której lekarze weterynarii i medycyny próbowali zrozumieć przyczyny i przebieg choroby, np. w ramach medycyny porównawczej, czy ochrony zdrowia publicznego [30, 34, 40]. Budowali w ten sposób, nie zawsze świadomie, współczesną ideę jednego zdrowia przejawiająca się we wspólnych badaniach naukowych, praktyce klinicznej, programach szczepień, poszukiwaniu nowych leków, czy zaawansowanym utechnicznieniu. Idea jednego zdrowia została wzmocniona przez termin „Jednego świata" (One World) użytego po raz pierwszy w trakcie debaty w połowie XX wieku na temat relacji międzynarodowych i w konsekwencji tego powołania UNESCO. Idea jednego świata w kontekście zdrowia została przywołana w latach 90-tych w trakcie pandemii AIDS, który wiązano z rezerwuarem dziko żyjących zwierząt. Oznaczało to spojrzenie na chorobę w szerszym kontekście niż na zoonozę, a także włączenie do badań więcej dyscyplin naukowych, w tym szeroko rozumianych nauk o życiu i środowisku [31]. W 2004 r. odbyło się spotkanie ekspertów z zakresu zdrowia publicznego, przedstawicieli i ekspertów reprezentujących instytucje chrony zdrowia i chorób zakaźnych zorganizowane przez amerykańskie towarzystwo ochrony przyrody (US-based Wildlife Conservation Society) pod hasłem jeden świat, jedno zdrowie, które zapoczątkowało serię kolejnych konferencji i spotkań popularyzujących ideę wspólnoty celów w ramach jednego świata [17]. Idea ta wkrótce znalazła odzwierciedlenie w reakcji świata na globalne zagrożenia dla zdrowia zwierząt i ludzi, jakim było pojawienie się wysoce zjadliwych wirusów grypy ptaków i epidemii grypy przenoszącej się na ludzi. Konsolidacja wysiłków osób, organizacji i instytucji zarówno krajowych, jak i międzynarodowych, w tym WHO, FAO i OIE doprowadziły do opanowania choroby i kontrolowania jej przebiegu i rozprzestrzeniania się. Epidemia ptasiej grypy przyczyniła się do odrodzenia się świadomości na temat ważności środowiska w powstawaniu chorób, rozumienia i ochrony tego co można określić jako „zdrowiem ekosystemu". Ostatnie dekady pokazują, że idea jednej medycyny we wspólnym świecie zyskuje na znaczeniu i splata się w działalności wielu instytucji, zarówno weterynaryjnych, medycznych, międzynarodowej ochrony zdrowia, jak i działalności rządów, na całym świecie. Mikrobiologia jako dyscyplina wywodząca się z nauk medycznych służy realizacji idei jednego zdrowia, dla którego zagrożeniem nadal pozostają czynniki zakaźne, przyhamowane, drzemią wyczekując sprzyjających okoliczności do rozprzestrzeniania się.

Piśmiennictwo

1. Anon.: HIPPO dilema (w) Windows on the wild: science and sustainability – a book of environmental education studies, New Africa Books, Claremont, 2005, s. 45–66
2. Belàk S., Karlsson O.E., Blomström A.-L., Berg M.: New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomics approaches. *Vet. Microbiol.* **165**, 95–101 (2013)
3. Beveridge W.I.B.: Frontiers in comparative medicine. Oxford University Press, London, 1972
4. Binek M.: Spojrzenie na postulaty Kocha po stu latach od śmierci ich twórcy. *Post. Mikrobiol.* **49**, 157–164 (2010)
5. Binek M.: Od postulatów Kocha do Socjomikrobiologii. *Medycyna Wet*. **67**, 151–156, (2011)
6. Binek M.: Historia mikrobiologii (w) Mikrobiologia lekarska, red. P. Heczko, A. Wróblewska, A. Pietrzyk, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2014, s. 1–11
7. Binek M., Kluciński W., Kupczyńska M., Motyl T.: Wydział Medycyny Weterynaryjnej (w) 200 lat tradycji Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Od Marymontu do Ursynowa 1816–2016. Księga Jubileuszowa, Tom 2. Historia wydziałow, Wyd. SGGW, Warszawa, 2016, s. 65–120
8. Bresalier M., Casssidy A., Woods A.: One health history (w) One Health: The theory and practice of integrated health approaches, red. J. Zinsstag, E. Schelling, D. Waltner-Toews, M. Whittaker, M. Tanner, CAB International, Wallingford, 2015, s. 1–15
9. Bujwid O.: Osamotnienie, Pamiętnik z lat 1931–1942, Wyd. Literackie, Kraków, 1990
10. Corner G.W.: The Rockefeler Institute: Origin and growth, 1901–1953. Rockefeller Institute Press, New York, 1964
11. Cunningham S.: The anatomist anatomis'd: An experimentral discipline in enlightment Europe. Ashgata, Farnham, 2010
12. Degueurce C.: Cloude Bourgelot and the creation of the veterinary schools. *C. R. Biol.* **335**, 334–342 (2012)
13. Davis M.F., Rankin S.C., Schurer J.M., Cole S., Conto L., Rabinowitz P.: Checklist for One Health epidemiological reporting of evidence (COHERE). *One Health*, **4**, 14–21 (2017)
14. Egerton F.N.: History of ecological sciences, part 46: From parasitology to germ theory. *Bull Ecolog. Soc. Amer.* **94**, 136–164 (2013)

15. Elliott P.: Vivisection and the emergence of experimental physiology in 19 century in France (w) Vivisection in historical perspective, red. N. Rupke, Croom Helm, London, 1987
16. Evans B.R., Leighton F.A.: A history of one health. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*. **33**, 413–420 (2014)
17. Gibbs E.J.: The evolution of one health: a decade of progress and challenges for the future. *Vet. Rec*. **174**, 85–91 (2014)
18. Gibbs S.E.J., Gibbs P.J.: The historical, present, and future role of veterinarians on one health. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **365**, 31–47 (2012)
19. Guerrini A.: Experimenting with human and animals: From Galen to animal rights. John Hopkinms University Press, Baltimore, 2003
20. Hannaway C.: Vick d'Azyr, anatomy and vision of medicine (w) French Medical Culture in the 19th century, red. A. La Berge, M. Feingold, Rodopi, Clio Medica 25, Amsterdam, 1994
21. Hardy A.: Animal disease and man: Making connections. *Perspec. Biol. Med*. **46**, 200–215 (2003)
22. Howard C.R.: Two disciplines, one priority: the seamless integration of human and veterinary microbiology is urgent. *Emer. Microbes Infect*. **1**, e10; doi: 10.1038/emi.2012.14
23. Judek J.: Udział polskich lekarzy weterynarii w zjazdach lekarzy i przyrodników polskich w latach 1869–1937. *Życie Wet*. **92**, 451–454 (2017)
24. Kaplan M.M.: The concept of veterinary public health and its application in the World Health Organization. *Bull. WHO.* **7**, 227–236 (1953)
25. Kaplan M.M.: Comparative medical studies of chronic degenerative diseases as a veterinary public health activity. *J. Am. Med. Wom. Ass.* **16**, 296–299 (1961)
26. Kirk R.G.W.: Between the clinic and the laboratory: Ethology and pharmacology in the work of Michael Robin Aleksander Chance, c. 1946–1964. *Medical History,* **53**, 513–536 (2009)
27. Koolmeers O.: Veterinary inspection and food hygiene in the twentieth century (w) Food science, policy and regulation in the twentieth century, red. D. Smith, J. Phillips, Routledge, London, 2000, s. 53–68
28. Leclainshe E.: A short history of Veterinary Bacteriology (w) Histoire de la Médicine Vétérinaire, red. E. Leclainche, Office du Livre, Toulouse, 1936, s. 779–784
29. Logan C.: Before there were standards: The role of test animals in the production of empirical generality in physiology. *J. Hist. Biol*. **35**, 329–363 (2002)
30. Mamzer H.: Expectation towards veterinarians as reflection of change in human – non-human relations. *Życie Wet*. **92**, 415–418 (2017)
31. Manlove K.R., Cross P.C. i wsp.: One Health or tree? Publication silos among the one health disciplines. *PLOS Biol.* **14**, e1002448, (2016)
32. Międzobrodzki J.: Nasi wielcy poprzednicy (w) Świat człowieka światem drobnoustrojów. 80 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, red. W. Hryniewicz Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, Warszawa, 2007, s. 9–18
33. Pal M., Gebrezabiher W., Rahman M.T.: The roles of veterinary, medical and environmental professionals to achieve one health. *J. Adv. Vet. Anim. Res*. **1**, 148–155 (2014)
34. Rabinowitz P.M., Natterson-Horowitz B.J., Kahn L., Kock R., Pappaioanou M.: Incorporating one health into medical education. *BMC Medical Education*. doi.10.1186/s12909-017-0883-6 (2017)
35. Ritvo H.: Border trouble; shifting the line between people and other animals. *Soc. Res.* **62**, 481–500 (1995)
36. Saunders L.Z.: Commentary: Virchow's contribution to Veterinary Medicine, celebrated then, forgotten now. *Vet. Path*. **37,** 199–207 (2000)
37. Schwabe C.: Veterinary medicine and human health, 3rd ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1984
38. Sherman D.M.: A global veterinary medical perspective on the concept of one health focus on livestock. *ILAR J*. **51**, 281–287 (2010)
39. Shope R.E.: Comparative medicine. Rockefeller Institute, New York, 1959
40. Sikkema R., Koopmans M.: One Health training and research activities in Western Europe. *Infec. Ecol. & Epidemiol.* **6**, http://dx.doi.org/10.3402/iee.v6.33703, (2016)
41. Steele J.: Veterinary public health: Past success, new opportunities. *Prev. Vet. Med.* **86**, 243–244 (2008)
42. Tarczyński S.: Zarys historii polskiej weterynarii z podstawami deontologii. PWN, Warszawa, 1990
43. Wainwright M., Ledeberg J.: History of microbiology. *Encyclopedia of Microbiology*, **2**, 419–437 (1992)
44. Wilkinson L.: Animals and disease: An introduction to the history of comparative medicine. Cambridge Press, Cambridge, 1992
45. Winslow W.C.E.A.: Some liders and landmarks in the history of microbiology. *Bact. Rev.* **14**, 99–114 (1950)
46. Woods A., Bresalier M.: One health, many histories. *Vet. Rec.* **174**, 650–654 (2014)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 106–116
http://www.pm.microbiology.pl

LISTERIOZA. WSPÓŁCZESNE POSTRZEGANIE ZAGROŻENIA EPIDEMIOLOGICZNEGO

Monika Lewańska*, Agnieszka Godela, Magdalena Myga-Nowak

Katedra Nauk Biomedycznych, Instytut Chemii Ochrony Środowiska i Biotechnologii,
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie

Wpłynęło w sierpniu 2017 r., zaakceptowano w styczniu 2018 r.

Streszczenie: Niebezpieczeństwo wynikające z obecności pałeczek z rodzaju *Listeria*, zwłaszcza *Listeria monocytogenes* w środowisku i produktach spożywczych, każdego roku przyczynia się do zejść śmiertelnych, zarówno wśród ludzi jak i zwierząt. Zdolność bakterii do egzystencji saprofitycznej oraz pasożytniczej, a także niewrażliwość na wiele czynników fizykochemicznych, znacząco ułatwia rozprzestrzenianie i gwarantuje dostęp do szerokiej grupy osobników podatnych na infekcję. Pomimo tego, że czynniki predysponujące do rozwoju zakażenia pociągają za sobą stosunkowo niską częstość jego wystąpienia, to charakteryzuje je wysoka śmiertelność i znaczny stopień hospitalizacji. Choroba objawia się najczęściej w postaci bakteriemii, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, a także zakażeń okołoporodowych. Sposób rozprzestrzeniania bakterii w organizmie sprawia, że wciąż identyfikowane są nowe typy zachorowań. Najnowsze badania dotyczące nabywania cech chorobotwórczości, wysokości dawki, czy rozwoju antybiotykooporności, a także liczne raporty dotyczące częstości występowania tych bakterii i powodowanych przez nie lokalnych epidemii, doprowadziły do zwiększenia częstości kontroli w tym zakresie i zmiany kwalifikacji choroby. Obecnie listeriozę postrzega się jako współczesne zagrożenie dla życia i zdrowia.

1. Wprowadzenie. 2. Rodzaj *Listeria*. Charakterystyka i cechy warunkujące chorobotwórczość. 3. Listerioza. Drogi rozprzestrzeniania. 4. Początek i przebieg zakażenia. 5. Kliniczne formy listeriozy. 5.1. Bakteriemia. 5.2. Infekcje ośrodkowego układu nerwowego. 5.3. Zakażenia okołoporodowe. 5.4. Zapalenie żołądka i jelit. 5.5. Spontaniczne bakteryjne zapalenie otrzewnej (SBP). 5.6. Zapalenie wsierdzia. 5.7. Zapalenie oraz ropień wątroby. 5.8. Infekcje skóry i oczu. 5.9. Infekcje mięśniowo szkieletowe. 6. Monitoring. 7. Normalizacja. 8. Podsumowanie

Listeriosis. Modern perception of epidemiological threat

Abstract: The presence of *Listeria* rods, especially *Listeria monocytogenes,* in the environment and food products, contributes each year to death of both humans and animals. The ability of bacteria to lead a saprophytic and parasitic existence as well as insensitivity to many physicochemical factors greatly facilitates the spread and guarantees access to a wide range of vulnerable organisms. Although the factors predisposing to infection result in a relatively low incidence of disease, infections are characterized by high mortality and often the need of hospitalization. The disease most often manifests itself in the form of bacteremia, meningitis and encephalitis as well as perinatal infections. The way *Listeria* spreads in the body contributes to the identification of new types of the disease. Recent studies on the acquisition of pathogenicity traits, dose and development of antibiotic resistance as well as numerous reports on incidence of these bacteria and the epidemics they caused, have led to more efficient monitoring of the pathogen . The qualification of the disease has also changed and, currently, listeriosis is considered a contemporary threat to life and health.

1. Introduction. 2. Genus *Listeria*. Characteristics and traits responsible for pathogenicity. 3. Listeriosis. Transmission pathways. 4. The beginning and course of the infection. 5. Clinical forms of listeriosis. 5.1. Bacteremia. 5.2. Central nervous system infections. 5.3. Perinatal infections. 5.4. Gastroenteritis. 5.5. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP). 5.6. Endocarditis. 5.7. Inflammation and liver abscess. 5.8. Skin and eye infections. 5.9. Musculoskeletal infection. 6. Monitoring. 7. Normalization. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*, listerioza, sapronoza,, zanieczyszczenie żywności, zoonoza
Key words: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, sapronosis, food contamination, zoonosis

1. Wprowadzenie

Pałeczki z rodzaju *Listeria*, głównie gatunek *L. monocytogenes*, stanowią istotny czynnik decydujący o rozwoju groźnych zakażeń u ludzi i zwierząt – listerioz, których przebieg często kończy się śmiercią. Od kilku lat notuje się tendencję wzrostową, zarówno co do liczby sporadycznych zachorowań, jak i wybuchów ognisk epidemicznych wywołanych przez te drobnoustroje [42]. *L. monocytogenes* po raz pierwszy została wyizolowana z krwi pacjenta z objawami przypominającymi mononukleozę zakaźną w 1929, a w 1936 uznano ją za przyczynę poronień, infekcji u noworodków oraz przypadków zapalenia opon mózgowych. Pierwszy przypadek listeriozy u zwierząt został opisany w 1933 roku u owiec z Nowej Zelandii. Spośród wszystkich szczepów w obrębie rodzaju, największe zagrożenie zarówno dla ludzi, jak i zwierząt stanowi gatunek *L. monocytogenes* [27]. Spożywanie produktów pochodzenia zwierzęcego wymusza już od lat konieczność ich kontroli, w tym diagnozowania chorób odzwierzęcych. Dane ECDC (Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób) i EFSA (Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności) donoszą, że najczęściej notowanymi i charakteryzującymi się utrzymującą tendencją wzrostową są kampylobakteriozy i infekcje

* Autor korespondencyjny: Monika Lewańska, Katedra Nauk Biomedycznych, Instytut Chemii Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, Al. Armii Krajowej 13/15; 42-200 Częstochowa; tel. 34 361 51 54; e-mail:monika.lewanska@ajd.czest.pl

werotoksycznymi pałeczkami *E. coli*. Raporty wskazują jednak również na istotne zagrożenie związane z obecnością pałeczek *z* rodzaju *Listeria* [28].

2. Rodzaj *Listeria*. Charakterystyka i cechy warunkujące chorobotwórczość

Pałeczki *Listeria* początkowo zaliczano do rodziny *Corynebacteriaceae*, głównie ze względu na morfologiczne podobieństwo ich cech, późniejsze badania wykazały jednak odrębność gatunków z rodzaju *Listeria* od maczugowców [26]. Opisane w 1926 roku przez Murray'a komórki bakterii, obecnie znane jako *L. monocytogenes,* początkowo zostały przez niego nazwane mianem *Bacterium monocytogenes*, nazwa ta została jednak później zmieniona na *Listerella.* Pirie pierwotnie określił je jako *Listerella hepatolytica*, a ponieważ nazwa *Listerella* była już zajęta, wprowadzono nazwę *Listeria*, która została zatwierdzona przez Sądową Komisję Bakteriologicznej Nomenklatury i Taksonomii w 1954 roku [11]. Dopiero w 1984 roku częściowe sekwencjonowanie 16S rRNA, jednoznacznie pozwoliło określić miejsce filogenetycznej przynależności gatunków z rodzaju *Listeria* do grupy skupiającej między innymi *Bacillus* czy *Lactobacillus*, gdzie *Brochothrix thermosphacta* jest najbliższym ich sąsiadem (93% podobieństwa sekwencyjnego) [26]. Sześć ogólnie znanych gatunków z rodzaju *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* i *L. grayi* można znaleźć w różnorodnych produktach spożywczych, jednak najczęściej izoluje się z nich *L. monocytogenes* i *L. inoccua*. W ciągu ostatnich kilku lat zidentyfikowano 11 nowych gatunków. *L. marthii, L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. fleischmannii*, *L. aquatica, L. floridensis*, *L. newyorkensis* oraz *L. booriae*. Izolaty pochodziły z produktów spożywczych oraz środowiska naturalnego i wszystkie są niepatogenne w stosunku do człowieka, ze względu na brak w ich genomach genów odpowiedzialnych za wirulencję. Stąd rodzaj *Listeria* zawiera obecnie 18 gatunków [4]. Bakterie te są krótkimi Gram-dodatnimi pałeczkami i nie tworzą otoczek ani przetrwalników [57]. Wszystkie gatunki wykazują zdolność ruchu w temperaturze poniżej 30°C, posiadają perytrychalny typ urzęsienia. Są tlenowe lub względnie beztlenowe. Wykazują zdolność wzrostu w warunkach tlenowych lub względnie beztlenowych w temperaturze od 0 do 45°C oraz w pH od 6 do ok. 9 [11]. Izoluje się je z różnorodnych środowisk i żywności, ponieważ są niewrażliwe na działanie wielu czynników fizykochemicznych oraz posiadają bardzo duże zdolności adaptacyjne. Ich wzrostu nie powstrzymuje nawet przechowywanie chłodnicze, które wydłuża czas ich generacji (czas potrzebny do podwojenia liczby w temperaturze 0,5°C wynosi 3–4 doby, w temperaturze 4°C 1–2 doby). Bakterie dobrze namnażają się w środowisku w znacznym zakresie pH, zwłaszcza o dużej zawartości wody, chociaż przeżywają także w produktach, gdzie aktywność wody wynosi 0,90. Tolerują wysokie stężenia chlorku sodu, azotanu sodu, także kwasów organicznych. Znoszą krótkotrwałą pasteryzację, długotrwałe wysuszenie i głębokie zamrażanie. Stosowanie modyfikowanej atmosfery (5–10% dwutlenku węgla) zwiększa szybkość ich wzrostu. Mutacje, transfer genów oraz zdolność do zwiększania odporności na wymienione czynniki, w sytuacji gdy bakterie znajdą się w warunkach stresowych powoduje, że ich eliminacja z żywności jest trudniejsza. Właściwa obróbka cieplna oraz wysokie ciśnienie sprawiają, że bakterie giną [63]. Poszczególne szczepy *L. monocytogenes*, w zależności od tego z jakiego środowiska są izolowane, wykazują istotne różnice przede wszystkim w ekspresji genów odpowiedzialnych za charakterystyczne cechy ich zjadliwości. Szczepy bakterii izolowane z produktów żywnościowych, środowiska naturalnego oraz od pacjentów z różnymi formami klinicznej listeriozy i chorych zwierząt, często różnią się znacząco chorobotwórczością, wykazują również odmienne reakcje na niekorzystne zmiany warunków środowiskowych [71]. Zachorowania ludzi i zwierząt wywoływane są powszechnie przez *L. monocytogenes*, wśród zwierząt 10% dotyczy infekcji spowodowanych przez *L. ivanovii*, u ludzi wyjątki stanowią przypadki wywołane przez *L. seeligeri* i *L. ivanovii* [27]. Wśród szczepów *L. monocytogenes*, dla człowieka niebezpiecznych jest trzynaście (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e, 7), jednak 96% przypadków wywołują trzy z nich: 1/2a, 1/2b oraz 4b [13, 37]. Najbardziej rozpowszechnionym w żywności serotypem jest 1/2a [15]. Najwięcej infekcji wywołują bakterie zaliczane do serotypu 4b, co wskazuje, na jego znacznie większą zjadliwość [16, 62]. Patogenne gatunki mają zdolność do produkcji szeregu czynników chorobotwórczych, pełniących istotne funkcje w procesie patogenezy, które umożliwiają im wnikanie i zakażanie organizmu żywicielskiego [13] (Tab. I).

Stosowanie nadmiernych ilości antybiotyków w medycynie i weterynarii, prowadzi do generowania antybiotykoopornych szczepów *L. monocytogenes* (ABR *L. monocytogenes*) w wyniku mutacji lub nabywania ruchomych elementów genetycznych i plazmidów [5]. Większość izolatów *L. monocytogenes* jest podatna na działanie szeregu antybiotyków, istnieje jednak kilka odstępstw. Należy uwzględnić, że prawie wszystkie szczepy wykazują naturalną oporność na cefalosporyny trzeciej generacji oraz fosfomycynę. W terapii niezwykle istotne jest precyzyjne określenie szczepu infekcyjnego. Na przykład w terapii niektórych infekcji dróg oddechowych stosowane są cefalosporyny, nieskuteczne w przypadku *L. monocytogenes*. W barwieniu Grama może dochodzić do błędów ze względu na podobieństwo

Tabela I
Czynniki wirulencji i ich funkcje decydujące o chorobotwórczości pałeczek *Listeria*

Czynnik wirulencji	Funkcja w przebiegu zakażenia
Internaliny	Umożliwiają wnikanie do komórek docelowych. – InlA – wiąże się z receptorem E – kateryną (powierzchnia komórek nabłonka, hepatocytów, komórek dendrytycznych, kosmków łożyskowych, hepatocytów) w obecności jonów wapniowych [66]. – InlB – wiąże się z receptorem c-Met, gC1qR, heparyną, peptydoglikanem siarczanu heparyny [27]. – InlC, InlD, InlE, InlF, InlG, InlH, InlI, InlJ [50].
Cząsteczki adhezyjne	– Białko p60 (CwhA lub Iap) – główne białko zewnątrzkomórkowe. Działa jako adhezyna i hydrolaza mureiny – Białko Ami – bierze udział w procesie adhezji i hydrolizie mureiny – Białko Auto – kontrola struktury ściany komórkowej w momencie wnikania do komórki gospodarza – Białko p104 – właściwości adhezyjne – Białko FbpA – wiąże się z fibronektyną, utrudnia rozpoznanie przez układ immunologiczny – Sortazy A i B rozpoznają typowy motyw prekursorów białek zakotwiczonych w osłonach, a następnie uczestniczą w sekrecji oraz zahaczeniu się białka w ścianie komórki [50].
Listeriolizyna O	Jest białkiem, pełniącym funkcje hemolizyny, które komórki bakteryjne wydzielają pozakomórkowo. Działa cytolitycznie, we wczesnej fazie zakażenia umożliwia defosforylację histonu H3 oraz deacetylację histonu H4 [27].
Fosfolipazy	– Fosfolipaza A współdziała z listeriolizyną O umożliwiając skuteczną lizę pierwotnego fagosomu [35]. – Fosfolipaza B ma zdolność do katalizowania hydrolizy wiązania glicerolofosforanowego cząsteczek fosfolipidów, który wraz z listeriolizyną O bierze udział w niszczeniu fagosomu, przede wszystkim wtórnego, gdzie umożliwia lizę podwójnej błony i uwolnienie się bakterii do cytoplazmy, uskuteczniając tym samym kolonizację sąsiednich komórek [31].
Białko Acta	Białko wywołujące indukcję aktyny gospodarza [53]. Umożliwia komórkom bakteryjnym swobodne przemieszczanie się w obrębie komórek żywiciela [52].
Metaloproteaza	Aktywacja bakteryjnej fosfolipazy B, która zachodzi w niskim fagosomalnym pH [72].
Deacetylaza peptydoglikanu (PgdA)	Uczestniczy w deacetylacji N-acetyloglukozaminy, która jest składnikiem peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii, przez co zmniejsza jej wrażliwość m.in. na lizozym [13].

morfologiczne do bakterii z rodzaju *Streptococcus*.[62]. Pomimo tego, że nadal większość antybiotyków wykazuje skuteczne działanie przeciwlisteryjne, to notuje się szczepy wykazujące oporność na ampicylinę, wankomycynę i gentamycynę, czyli kluczowe antybiotyki rutynowo wykorzystywane w przypadku leczenia listeriozy [41]. W środowisku przetwarzającym żywność wykrywa się szczepy oporne na klindamycynę, tetracyklinę [30], trimetoprim [5], florfenikol [36] kwas nalidyksowy [3], erytromycynę, streptomycynę, kanamycynę [38], chloramfenikol czy ciprofloksacynę [68], a nawet szczepy wielooporne w stosunku do znacznej liczby antybiotyków (powyżej 10) [61].

3. Listerioza. Drogi rozprzestrzeniania

Chorobotwórcze gatunki z rodzaju *Listeria*, są przyczyną występowania objawowych zakażeń zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, które w obu przypadkach określane są jako listeriozy. Ta jednostka chorobowa jest od lat zaliczana do typowych chorób odzwierzęcych, tak zwanych antropozoonoz. Ze względu na rozprzestrzenianie określana jest również jako sapronoza [33], czyli infekcja wywoływana przez drobnoustroje patogenne, naturalnie zasiedlające różnorodne ekosystemy środowiskowe, głównie glebę i wodę, dodatkowo charakteryzujące się polipatogennością. Ze względu na to pałeczki *Listeria* możemy zaliczyć do grupy mikroorganizmów wywołujących tego typu infekcje [2]. Bakterie mogą przenosić się na gospodarza, za pośrednictwem zewnętrznych czynników środowiskowych, takich jak gleba, woda, ścieki, zanieczyszczone rośliny, odchody zwierząt, padlina, pasze, kiszonki oraz śmieci domowe. Najważniejszą cechą bytujących w tych miejscach chorobotwórczych gatunków *Listeria* jest fakt, że mogą się one namnażać zarówno w środowisku zewnętrznym (faza saprofityczna), jak i w organizmach żywych (faza pasożytnicza) [33]. Bakterie mogą dostawać się do środowiska, także za pośrednictwem organizmów chorych lub nosicieli i w następstwie infekcji rozsiewać do miejsc, gdzie w sprzyjających warunkach przeżywają, namnażają się i mogą powodować zakażenia u nowych osobników, w tym także ludzi [34]. Bardzo ważny jest problem bezobjawowego nosicielstwa. Bakterie często izoluje z przewodów pokarmowych oraz migdałków zdrowych zwierząt. Szacuje się, że wśród ludzi zjawisko to dotyczy około 5% do 10% populacji. U zdrowych ludzi, bakterie izoluje się najczęściej z przewodu pokarmowego i pochwy, rzadziej z układu oddechowego [27]. Głównym miejscem lokalizacji tych bakterii jest przewód pokarmowy, w związku z czym drobnoustroje

wraz z kałem przedostają się bezpośrednio do otoczenia [50] lub wraz ze ściekami, są odprowadzane do pobliskich oczyszczalni, gdzie z łatwością przechodzą cały proces technologiczny oczyszczania ścieków i trafiają do okolicznych rzek [1]. Źródłem bakterii mogą być także dzikie i domowe ssaki, takie jak gryzonie, owce, kozy, bydło, świnie, ale także ptaki krukowate, drób, czy mewy [33]. Pałeczki *Listeria* wyizolowano także od ryb, gadów oraz innych zwierząt kręgowych i bezkręgowych, w tym także od owadów [50]. Środowisko naturalne jest zatem głównym źródłem zanieczyszczenia pałeczkami *Listeria* pasz oraz surowej żywności i może przyczynić się do skażenia zakładów przetwórstwa żywności, a także środowisk domowych, czy handlowych, które w następstwie mogą prowadzić do zanieczyszczania finalnych produktów spożywczych chorobotwórczymi szczepami *Listeria* [34]. Głównym powodem skażenia żywności jest niedostateczne przestrzeganie odpowiedniej praktyki produkcyjnej oraz higieny w zakładach produkujących wyroby spożywcze, niewystarczająca obróbka cieplna [58], bezpośredni kontakt z chorym, bądź zainfekowanym zwierzęciem lub też jego odchodami [59]. Dodatkowo, stały napływ świeżych surowców na linie produkcyjne w zakładach przetwórstwa żywności, umożliwia bakteriom tworzenie biofilmów, niekiedy bardzo trudnych do usunięcia, co przyczynia się każdego roku do generacji ogromnych strat w sektorze spożywczym [9, 67]. W Stanach Zjednoczonych pałeczki *L. monocytogenes* są trzecim najbardziej kosztownym patogenem żywnościowym, po *Clostridium botulinum* i *Vibrio vulnifi* [47]. Warunki chłodnicze, krótka pasteryzacja, czy mrożenie, nie chronią żywności przed namnażaniem patogenu. Patogenne *L. monocytogenes* izolowano z różnorodnych produktów spożywczych, które mogły być źródłem infekcji. Produkty te to przede wszystkim sery miękkie i dojrzewające, surowe mleko, śmietana, jaja, lody, mięso, wędzone ryby, wieprzowina, kiełbasy, surowe warzywa i owoce, ale także mrożonki i łatwo dostępne gotowe zestawy dań typu RTE (Ready to Eat) [28]. Rozprzestrzenianie pałeczek *Listeria* drogą aerogenną stanowi znacznie rzadsze przypadki [60]. Nieliczne zgłoszenia donoszą o możliwości bezpośredniej transmisji bakterii od zainfekowanych zwierząt na ludzi, a nawet z człowieka na człowieka [59]. Pomimo tego, że liczba zachorowań powodowana przez te bakterie nie jest zbyt wielka (zapadalność wynosi od 2 do 15 mln. osób na rok) [50], to choroba charakteryzuje się wysoką śmiertelnością (20–30%) oraz znacznym odsetkiem hospitalizacji (> 90%) [67]. Pałeczki *Listeria* w ostatnich latach przyczyniły się do wystąpienia licznych epidemii związanych z zakażeniami pokarmowymi, często tragicznych w skutkach, co doprowadziło do zmiany kwalifikacji choroby i postrzegania jej jako powszechne i realne zagrożenie dla życia [50].

4. Początek i przebieg zakażenia

Zagrożenie zachorowania na listeriozę w mniejszym stopniu dotyczy osobników zdrowych, zakażenia są szybko wygaszane, a nielicznymi objawami są niekiedy łagodne stany przypominające grypę [10]. Czasem dochodzi do bezobjawowego nosicielstwa, najczęściej w przewodzie pokarmowym. Wydalenie bakterii wraz z kałem, w wyjątkowych przypadkach utrzymuje się do około roku, zwykle jednak jest krótkotrwałe. Bakterie stanowią poważne zagrożenie szczególnie w przypadku ludzi starszych, osób z obniżoną odpornością: po przeszczepach, chorych na AIDS, cukrzycę czy nowotwory. Najbardziej narażone są kobiety w ciąży ze względu na zmiany hormonalne zachodzące w ich organizmach, co znacząco zwiększa ich podatność na infekcję [60]. Wystąpienie choroby u ciężarnych, nie pozostaje bez konsekwencji dla płodu, powodując w niektórych przypadkach poronienia, martwe urodzenia lub zespoły chorobowe. [28]. W przypadku dzieci, które osiągnęły wiek powyżej jednego miesiąca życia, listeriozę diagnozuje się bardzo rzadko. Wśród zwierząt, najczęściej chorują owce, kozy i bydło, chociaż infekcja dotyka także inne, zarówno domowe, jak i dzikie zwierzęta [60]. Biorąc pod uwagę stosunkowo niską częstość występowania listeriozy w populacji, pomimo częstego narażenia, zakłada się, że choroba najczęściej pojawia się w wyniku ekspozycji na wysokie dawki, a częstość zakażenia jest do niej wprost proporcjonalna i w znacznym stopniu, zależy od indywidualnej odporności atakowanego organizmu oraz od rodzaju szczepu infekcyjnego i rodzaju wektora [9]. O tym czy dana jednostka zachoruje na skutek zadziałania danego czynnika chorobotwórczego, decydują czynniki zależne od integracji stanu gospodarza, rodzaju patogenu oraz źródła zakażenia [70, 9]. Według szacunków FAO/WHO wartość LD_{50} dla człowieka wynosi 1.9×10^6 jtk [70]. Okres inkubacyjny trwa od 3 do nawet 70 dni, zwykle jednak jest to około 31 dni od momentu zakażenia [60]. Dlatego też, ze względu na dość długi czas pomiędzy ekspozycją, a pojawieniem się objawów chorobowych uzyskanie dokładnych informacji na temat dawki infekcyjnej jest niezwykle trudne [9]. Pałeczki *Listeria* należą do typowych patogenów wewnątrzkomórkowych [69], podobnie jak bakterie z rodzaju *Mycobacerium, Salmonella, Shigella* i *Legionella* [39]. Po wniknięciu do organizmu mikroorganizmy, które zdołały przetrwać niesprzyjające kwaśne warunki panujące w żołądku, a także obecność enzymów proteolitycznych, czy wielu innych czynników stresowych, przedostają się dalej do jelit, gdzie za pośrednictwem ich nabłonka, dokonują inwazji tkanek swojego żywiciela. Przekroczenie bariery jelitowej powoduje przedostanie się bakterii do krwi i limfy, a za ich pośrednictwem, w krótkim czasie rozprzestrzenianie po całym organizmie. W trakcie

kolonizacji tkanek gospodarza *L. monocytogenes* aktywuje mechanizmy, umożliwiające jej uniknięcie lub ograniczenie odpowiedzi immunologicznej żywiciela, co ułatwia ucieczkę z fagosomu do cytoplazmy, gdzie może swobodnie się namnażać, a następnie rozprzestrzeniać do sąsiadujących komórek i dalej do tkanek i narządów [13].

5. Kliniczne formy listeriozy

Najczęściej występującymi postaciami listeriozy u ludzi są: bakteriemia, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz mózgu, a także zakażenia okołoporodowe. Chorobotwórcze pałeczki z rodzaju *Listeria*, mogą wywołać również zapalenie żołądka i jelit, zapalenie wsierdzia, zapalenie otrzewnej, zapalenie oraz ropień wątroby, infekcje skórne, a także infekcje mięśniowo-szkieletowe [10]. U zwierząt listerioza przejawia się najczęściej poprzez zapalenia mózgu, posocznicę oraz zakażenia okołoporodowe [57].

5.1. Bakteriemia

Po wtargnięciu drobnoustrojów do krwi, może dojść do rozwoju posocznicy oraz innych, ciężkich i niebezpiecznych dla życia infekcji. Zjawisko bakteriemii występuje u 1/3 pacjentów chorych na listeriozę [29] i może powodować rozwój ciężkiej sepsy [47]. Śmiertelność może osiągnąć nawet 30% [10]. U ludzi objawy kliniczne wywołane obecnością pałeczek *Listeria* we krwi, to przeważnie gorączka i bóle mięśniowe, czasem mogą wystąpić także inne objawy prodromalne wraz z nudnościami i biegunką. Zdrowe jednostki mogą przejść krótkotrwałą bakteriemię bezobjawowo [29]. Wśród zwierząt bakteriemię obserwuje się szczególnie u młodych osobników, u których najczęstszymi objawami są: wysoka temperatura, przyspieszone tętno i oddech, brak łaknienia i ogólne osłabienie. Infekcja zwykle kończy się śmiercią osobnika po około 2 dniach [60].

5.2. Infekcje ośrodkowego układu nerwowego

Pałeczki *L. monocytogenes*, to jeden z najważniejszych czynników etiologicznych związanych z wywołaniem zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu (trzecia po *Streptococcus pneumoniae* i *Neisseria meningitidis*) [7]. Dotyczy przede wszystkim ludzi powyżej 50 roku życia oraz leczonych kortykosteroidami, osób po przebytych przeszczepach, czy chorych na chłoniaka. U ludzi wyróżnia się dwie postacie listeryjnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu [10].

Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u ludzi – charakteryzuje się między innymi sztywnieniem karku, bólami głowy, podwyższoną temperaturą ciała [42], zaburzeniami ruchowymi (drżenie mięśni, ataksja, drgawki), napadami padaczkowymi [29]. Objawy chorobowe pojawiają się bardzo wcześnie, bo już w kilka dni po zakażeniu [42]. Stwierdza się obecność bakterii we krwi, rzadziej w barwionych metodach Grama preparatach, sporządzonych z płynu mózgowo-rdzeniowego. Śmiertelność wynosi około 22% [29].

Zapalenie tyłomózgowia u ludzi – charakteryzuje się pojawiającymi się dość wcześnie bólami głowy, nudnościami i wymiotami. W późniejszych stadiach rozpoznaje się uszkodzenia nerwów czaszkowych, często także zaburzenia prawidłowej funkcji móżdżku, objawiające się bezładem ruchowym, czasem występuje niedowład połowiczy i zaburzenia świadomości [26]. Stwierdza się obecność bakterii zarówno we krwi, jak i płynie mózgowo rdzeniowym. Rezonans magnetyczny uwidocznia niekiedy małe ropnie ulokowane w móżdżku oraz międzymózgowiu. W przypadku wystąpienia bezładu ruchowego oraz porażenia nerwów, objawy te mogą się utrzymywać pomimo leczenia, śmiertelność w takich przypadkach wynosi około 50% [10].

Zapalenie mózgu u zwierząt – występuje przede wszystkim u zwierząt dorosłych, dotyczy często zwierząt domowych, głównie bydła, owiec i kóz [32]. Pomimo tego, że droga pokarmowa jest główną przyczyną powstania tego typu infekcji, to istnieją dowody, że do zapalenia mózgu, może dochodzić także w wyniku wnikania bakterii poprzez otarcia jamy ustnej, warg, nozdrzy, czy zębów [54]. Do początkowych objawów należy sztywny chód, skurcz mięśni i porażenie kończyn [60]. Inne objawy neurologiczne to krążący chód, nadmierne ślinienie i jednostronny paraliż głowy [46]. W późniejszych stadiach choroby, zwierzęta nie są w stanie samodzielnie jeść, ze względu na paraliż głowy i języka, później przybywają już tylko w pozycji leżącej, mają drgawki i głowę przechyloną do boku. Przebieg choroby waha się od 1 do 4 dni od momentu pojawienia się pierwszych objawów. Chore osobniki zwykle giną [8].

5.3. Zakażenia okołoporodowe

Pałeczki z rodzaju *Listeria* stanowią jeden z najważniejszych czynników powodujących zakażenia okołoporodowe pochodzenia bakteryjnego. Typowe dla zakażeń tymi bakteriami są ronienia, zbyt wczesne porody oraz zespoły posocznicowych zakażeń płodu [29].

Podczas infekcji u kobiety w ciąży dochodzi do łagodnych zaburzeń odporności komórkowej, co między innymi sprawia, że kobiety w ciąży stają się bardziej podatne na listeriozę. Ryzyko jest około 17 razy wyższe, niż w przypadku kobiet nie będących w ciąży. Pałeczki *Listeria* mają zdolność do przechodzenia przez łożysko i namnażania się w nim, co sprawia, że stają się nieosią-

galne dla mechanizmów obronnych matki. Zdolność do ich przenikania z komórki do komórki, również ułatwia transmisje bakterii z matki na płód. Listerioza u kobiet w ciąży często występuje wraz z bakteriemią [29]. Choroba objawia się najczęściej symptomami grypopodobnymi, takimi jak bóle mięśni, złe samopoczucie i gorączka, czasem także dochodzi do skurczów macicy i zapalenia miedniczek nerkowych [12]. Infekcja może wystąpić w dowolnym momencie ciąży, jednak najczęściej pojawia się w trzecim trymestrze, gdy następuje największy spadek odporności komórkowej. 22% zakażeń okołoporodowych, prowadzi do porodu martwego dziecka lub jego szybkiego zgonu [29]. Często także dochodzi do poronień, przedwczesnych porodów i zainfekowania noworodków [12]. Wczesna diagnoza i zastosowanie antybiotykoterapii może prowadzić do urodzenia całkowicie zdrowego dziecka [29].

U noworodków występują dwie formy listeriozy noworodkowej. Wczesna, gdy do zakażenia dojdzie wewnątrzłonowo, za pośrednictwem łożyska od chorej matki, oraz późna, którą noworodek nabywa podczas porodu w wyniku kontaktu z bakteriami obecnymi w drogach rodnych zdrowej matki nosicielki, czasem także może wystąpić zakażenie drobnoustrojami z sali porodowej, jest to wtedy zakażenie szpitalne [42]. Początki choroby mogą objawiać się sinicą, bezdechem, niewydolnością oddechową, zapaleniem płuc, czy wysypką grudkowo-plamkowa, ponadto może wystąpić małopłytkowość i anemia. Często obecność bakterii stwierdza się w smółce [6]. Najwyższe stężenie bakterii znajduje się w płucach i jelitach, co sugeruje, że do infekcji doszło jeszcze w życiu płodowym [29]. W wielu narządach (śledziona, płuca, wątroba, mózg, skóra, nerki), diagnozuje się liczne rozsiane ziarniniaki. Infekcję określa się nazwą *granulomatosis infantiseptica*, charakteryzuje się ona wysoką śmiertelnością od 35 do 55% [10]. Późne infekcje to przede wszystkim zapalenia opon mózgowych (94%). Do głównych objawów należy gorączka, drażliwość, wypukłe ciemiączko i inne objawy oponowe. W płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdza się obecność pałeczek *Listeria*. Śmiertelność w przypadku późnej postaci choroby jest dość niska, o ile zostanie wcześnie zdiagnozowana [6].

U ciężarnych zwierząt i ich potomstwa przyczyną infekcji jest najczęściej bakteriemia występująca u matki. W takiej sytuacji bakterie przenikają przez łożysko do płodu w przeciągu 24 godzin [8]. Infekcja może nastąpić także na skutek kontaktu z bakteriami obecnymi w macicy, gdzie często powodują zapalenia [32]. W przypadku niezaawansowanej ciąży, zakażenie najczęściej kończy się poronieniem w ciągu 5 do 10 dni [8]. Sytuacje te dotyczą powszechnie przeżuwaczy, chociaż występują także u innych gatunków zwierząt [32]. W późniejszych stadiach ciąży, infekcja powoduje urodzenie martwego potomstwa, lub zainfekowanych zwierząt [8]. Nowonarodzone, zakażone osobniki są zwykle słabe oraz niezdolne do samodzielnego życia, chowają się w kątach, opierają o otaczające przedmioty i kręcą w koło. Zwierzęta te zwykle giną na skutek rozwoju posocznicy [60].

5.4. Zapalenie żołądka i jelit

Infekcja najczęściej rozwija się w następstwie spożycia żywności silnie zanieczyszczonej chorobotwórczymi pałeczkami *Listeria,* zwłaszcza u osób zdrowych [62]. Objawy pojawiają się zwykle po około 24 godzinach od spożycia zakażonych pokarmów, jednak okres ten, w zależności od przypadku, może wynosić od 6 godzin, do nawet 10 dni [48]. U chorych obserwuje się najczęściej bóle mięśni, zmęczenie, zawroty głowy, gorączkę, dreszcze, nudności, wymioty, biegunki oraz skurcze brzucha [25]. Czas trwania objawów wynosi zwykle od 1 do 3 dni, czasem może przedłużyć się do około tygodnia. Bardziej narażone na tego typu infekcje są osoby leczone preparatami powodującymi zobojętnianie soku żołądkowego, lub chorzy na nowotwory przewodu pokarmowego. W większości przypadków hospitalizacja nie jest wymagana, dotyczy około 2% chorych [48].

5.5. Spontaniczne bakteryjne zapalenie otrzewnej (SBP)

Rheingold był pierwszym, który opisał SBP wywołane pałeczkami *Listeria* u pacjenta z marskością wątroby w 1977 roku. Jest to schorzenie bardzo rzadko wywołane przez bakterie *L. monocytogenes* [64]. SBP występuje u osób z przewlekłymi chorobami wątroby, osób poddawanych częstym dializom otrzewnowym, z marskością wątroby głównie spowodowanej alkoholizmem, czasem także po zakażeniu HCV [51]. Bakterie dostają się do otrzewnej, wędrując z jelit poprzez węzły chłonne krezki, a stamtąd prosto do jamy otrzewnej, czynnikiem sprzyjającym jest powstanie wodobrzusza [17]. Bakterie izoluje się z płynu opłucnej lub płynu puchlinowego. Śmiertelność może sięgać 25% [64].

5.6. Zapalenie wsierdzia

W przypadku 10% pacjentów, u których obserwuje się ciężki przebieg infekcyjny, dochodzi do zajęcia serca [49]. Pałeczki *Listeria* zajmują przede wszystkim zastawki serca, najczęściej występują u osób z wszczepioną protezą zastawki. Drobnoustroje są często źródłem zatorów bakteryjnych [14, 42]. Do objawów listeryjnego zapalenie wsierdzia zalicza się dreszcze, podwyższenie temperatury, niewydolność serca na skutek zatoru. Przy tej postaci choroby, często powstają ropnie w narządach wewnętrznych [10]. Ciężkość powikłań i wysokie

ryzyko śmiertelności wymaga podjęcia natychmiastowego leczenia, jednak rozpoznanie listeryjnego zapalenia wsierdzia jest trudne [65]. U dzieci taką postać choroby stwierdza się wyjątkowo rzadko. Śmiertelność sięga nawet 50% [14].

5.7. Zapalenie oraz ropień wątroby

Schorzenia wątroby wywoływane przez bakterie *Listeria* są u ludzi rzadkie, często natomiast występują u zwierząt. Wiążą się najczęściej z bakteriemią, w wyniku której drobnoustroje rozprzestrzeniają się do różnych narządów. System wrotny również może przyczyniać się do zaatakowania wątroby przez pałeczki [44]. Główne objawy to gorączka, a także zażółcenie powłok ciała. Biopsja wskazuje na mikroropnie w wątrobie. Na taki przebieg choroby, narażone są osoby z marskością lub przeszczepem wątroby, także cukrzycy i alkoholicy. Śmiertelność sięga 50% [10].

5.8. Infekcje skóry i oczu

Dolegliwości te dotyczą najczęściej lekarzy weterynarii, często dochodzi do nich w wyniku kontaktu z płynem owodniowych lub łożyskiem, podczas odbierania porodów zainfekowanych zwierząt. Zmiany skórne występują najczęściej w postaci grudek lub krostek. Infekcja oczu objawia się przeważnie zapaleniem spojówek [10]. Do zakażeń skóry i oczu dochodzi także poprzez kontakt z chorym zwierzęciem lub zakażonym materiałem klinicznym [42]. *L. monocytogenes* może powodować infekcje oczu i zapalenie rogówki także u przeżuwaczy, co jest najczęściej wynikiem bezpośredniego kontaktu z bakteriami obecnymi w paszach, zwłaszcza w kiszonkach [46].

5.9. Infekcje mięśniowo szkieletowe

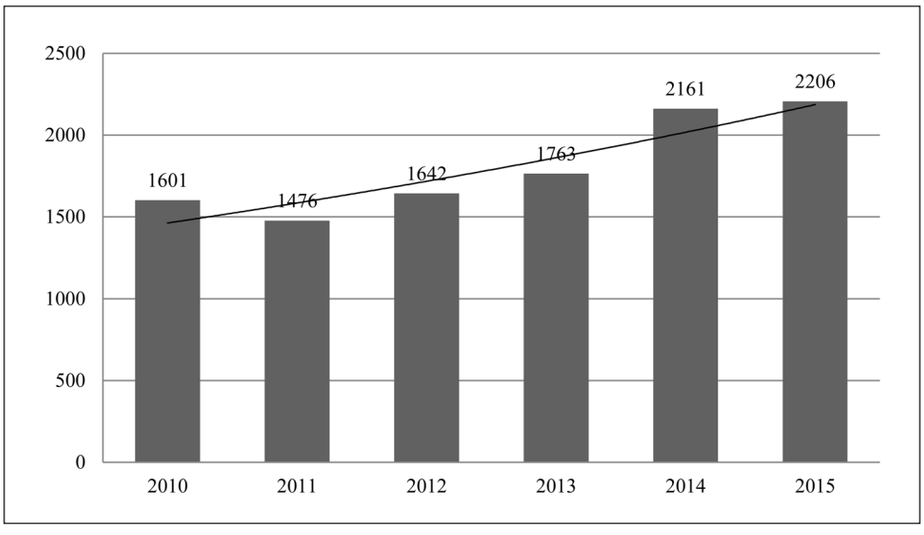
Pałeczki *Listeria* dość rzadko są przyczyną zapalenia szpiku kostnego. Czynnikami, które predysponują do rozwoju choroby, jest najczęściej białaczka, cukrzyca i długotrwałe leczenie kortykosteroidami. W tym przypadku, mimo skutecznej antybiotykoterapii, może dochodzić do nawrotów choroby. Mikroorganizmy mogą wywołać również septyczne oraz reumatoidalne zapalenie stawów. Infekcje te obserwuje się najczęściej u osób z protezami kolanowymi oraz biodrowymi, ale mogą objąć także zdrowe stawy. Zgony zdarzają się rzadko [24].

Rozpoznanie listeriozy umożliwia obraz objawów klinicznych i diagnostycznych. Bakterie odnajdowane są głównie we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym, smółce noworodków, wydzielinie z pochwy i stolcu. Główną metodą detekcji jest posiew mikrobiologiczny i badania serologiczne. Jedyną skuteczną metodą leczenia jest antybiotykoterapia. Podstawowymi chemoterapeutykami są ampicylina i amoksycyklina, czasem również wankomycyna. Pozostałe to meropenem, linezolid i rifampicyna [40]. W kuracji często stosuje się kombinowaną terapię z wykorzystaniem penicyliny lub ampicyliny z gentamycyną. Synergistycznie działanie tych antybiotyków pozwala na sukcesywne niszczenie mikroorganizmów [5, 62]. Pacjenci z uczuleniami na penicyliny leczeni są przy użyciu sulfametaksazolu. Ze względu na częste infekcje u kobiet w ciąży i ograniczenia w podawaniu wielu preparatów stosuje się erytromycynę [40].

6. Monitoring

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) pełniący rolę kluczowego narzędzia Unii Europejskiej we wszystkich aspektach związanych pośrednio i bezpośrednio z bezpieczeństwem żywności i pasz, pełni również rolę sprawozdawczą. Dzięki współpracy międzynarodowej każdego roku wydawane są obszerne raporty, dotyczące monitoringu rynku żywieniowego obejmującego obszar wszystkich krajów członkowskich. Polski punkt koordynacyjny EFSA powołany w 2008 r. mieści się w Głównym Inspektoracie Sanitarnym w Warszawie, współpracującym w tym zakresie z Ministerstwem Rolnictwa i Rozwoju Wsi [28]. Sprawozdanie podsumowujące sytuację Unii Europejskiej z 2015 r., w zakresie tendencji i źródeł chorób odzwierzęcych, a także odzwierzęcych czynników chorobotwórczych i niebezpieczeństw przenoszonych przez żywność, donosi o 2 206 potwierdzonych przypadkach listeriozy w 28 państwach członkowskich i stawia jednostkę na piątym miejscu wśród najczęściej wykrywanych chorób odzwierzęcych po kampylobateriozie, salmonellozie, jersiniozie i infekcjach STEC. Liczba zachorowań na listeriozę na terenie UE, w ciągu ostatnich lat wskazuje na tendencje wzrostową (Rys.1).

Zgłaszanie przypadków ludzkiej listeriozy jest obowiązkowe na terenie większości państw europejskich, w tym także i w Polsce, wyjątek stanowi Wielka Brytania, Hiszpania Belgia i Luksemburg. Na terenie UE w 2015 roku z powodu choroby zmarło 270 osób. Infekcje zgłaszano głównie w starszej populacji, w grupie wiekowej powyżej 64 roku życia [18]. W naszym kraju w 2015 roku zarejestrowano 70 przypadków tej choroby, przy czym w jednym była to postać wrodzona. W 2014 potwierdzono 90 przypadków w tym 86 w postaci pokarmowej i 4 wrodzonej listeriozy. Wymiana informacji dotycząca kontroli jakości pasz, żywności i materiałów mających kontakt z żywnością jest możliwa, także dzięki Systemowi Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach (RASFF). Sieć złożona jest z licznych punktów kontaktowych reprezentujących



Rys. 1. Liczba zachorowań na listeriozę w UE w latach 2010–2015 [18–23]

Komisję Europejską (KE), EFSA, kraje członkowskie UE oraz EFTA (Norwegia, Szwajcaria, Islandia, Lichtenstein). Krajowy punkt kontaktowy (KPK) działa od 2006 roku i zlokalizowany jest przy Głównym Inspektoracie Sanitarnym, który pełni nad nim funkcje nadzorcze i w razie konieczności powiadamia KE o niebezpieczeństwie. Polskie władze kontrolują przedsiębiorstwa z branży spożywczej i paszowej pod względem przestrzegania wymagań określonych w prawie żywnościowym i paszowym. Dzięki sprawnie działającemu systemowi w razie potrzeby bezzwłocznie podejmują działania w zakresie lokalnym uniemożliwiając rozprzestrzenianie niebezpiecznych produktów. W 2015 roku członkowie sieci RASFF zgłosili 24 przypadki wykrycia pałeczek *L. monocytogenes* w produktach pochodzących z Polski. Znaczna część doniesień była związana z wykryciem bakterii w rybach i produktach rybnych, zwłaszcza w partiach łososia wędzonego na zimno na terenie naszego kraju. Niezgodne z normami próbki pochodziły od tego samego polskiego producenta [28]. Doniesienia EFSA dotyczące wykrywalności pałeczek *L. monocytogenes* wśród zwierząt w 2015 roku, dotyczą głównie bydła, owiec i kóz. Bakterie odnajdowano także wśród świń, brojlerów, kotów, lisów, psów oraz wśród zwierząt dzikich i tych z ogrodów zoologicznych [18].

7. Normalizacja

Prawo Unii Europejskiej odpowiada za bezpieczeństwo i niweluje zagrożenia na każdym etapie łańcucha żywieniowego, w tym szeroko dotyczy również niebezpieczeństw mikrobiologicznych. Prawo zakłada kryteria z zakresu kontroli i bezpieczeństwa, nie tylko produktów żywnościowych, ale i pasz stwierdzając, że w każdym z tych przypadków produkt finalny powinien być wolny od mikroorganizmów, ich metabolitów oraz toksyn, w ilościach zagrażających zdrowiu i życiu ludzi i zwierząt. Założenia unijne umocowanie prawne odnajdują w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych [43]. Rozporządzenie to określa między innymi, także kryteria dotyczące pałeczek *L. monocytogenes*. I tak w przypadku żywności gotowej przeznaczonej do spożycia przez niemowlęta i do specjalnego zastosowania medycznego, bakterie nie mogą być obecne w żadnej z 10 próbek badanego produktu o wadze 25 g każda. Natomiast dla żywności gotowej do spożycia, umożliwiającej wzrost bakterii z tego rodzaju, ale nie podlegającej spożyciu przez niemowlęta i nie stosowanej medycznie, w momencie wyjścia produktu spod kontroli przedsiębiorstwa będącego jego producentem, nie powinna zawierać bakterii w żadnej z 5 próbek o wadze 25 g każda, w przypadku, gdy producent nie może udowodnić, że limit dla wytwarzanego produktu nie przekroczy 100 jtk/g w przeciągu trwania całego okresu przydatności do konsumpcji, w przeciwnym wypadku limit ten wynosi 100 jtk/g, i jest taki sam jak dla żywności gotowej, w której nie zakłada się możliwości wzrostu tych bakterii [56]. W przypadku pasz ustalone kryteria mikrobiologiczne nie są aż tak precyzyjne. Rozporządzenie (WE) Nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 12 stycznia 2005 r. ustanawiające wymagania dotyczące higieny pasz, określa powinność podmiotów rynku paszowego do przestrzegania kryteriów mikrobiologicznych bez szczegółowego rozwinięcia [55]. Prawo europejskie odpowiedzialnością za bezpieczeństwo pasz, obarcza więc przedsiębiorstwa produkujące pasze. Badania pod kątem zanieczyszczeń mikrobiologicznych, według obowiązujących do tej pory wymagań i przepisów, dotyczą określenia

obecności bakterii *Salmonella* w 25 g produktu paszowego, a dla odzwierzęcych materiałów paszowych i karmy surowej, liczebności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae.* Prawidłowy i precyzyjny sposób pobrania, transportu, przygotowania i przeprowadzenia analizy próbek, powtarzalność, a także rzetelne formułowanie wiarygodnych wniosków, wymaga od personelu laboratoryjnego zastosowania i przestrzegania właściwych normatywnych metod badawczych. Zapewnienie powyższych warunków determinuje wykorzystanie opracowanych norm międzynarodowych (ISO) i europejskich (EN), akceptowanych i wprowadzanych w naszym kraju jako polskie (PN). Ogólne zasady postępowania w przypadku analizy próbek pod kątem mikrobiologicznym w naszym kraju reguluje szereg norm m.in. norma PN-EN ISO 7218:2008/A1:2013-10 „Mikrobiologia żywności i pasz. Ogólne wymagania i zasady badań mikrobiologicznych." oraz normy z serii ISO 6887. Wykrywanie obecności pałeczek *L. monocytogenes* w Polsce, zarówno w próbkach żywnościowych, paszowych i środowiskowych oparto o normę PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 „Mikrobiologia żywości i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *L. monocytogenes*. Metoda wykrywania obecności." Z kolei oznaczanie liczby tych bakterii oparto o drugą część normy PN-EN ISO 11290-2:2000/A1:2005 „Mikrobiologia żywości i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *L. monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby. Nowelizacja z 2005 wprowadza zmianę w składzie pożywki izolacyjnej i teście na zdolność do hemolizy, a próg wykrywalności wobec zastosowanej metody jest równy 10 jtk w 1 ml i 100 jtk w 1 g analizowanej próby [43].

8. Podsumowanie

Zachorowanie na listeriozę może zakończyć się zgonem i choć choroba dotyka zwykle osób z grupy ryzyka, to diagnozuje się ją także u osób zdrowych. Infekcja może przebiegać bezobjawowo lub przypominać grypę, jednak w porę niezdiagnozowana, ma szansę przerodzić się w stany zagrażające życiu. Dane epidemiologiczne, prócz tendencji wzrostowej nadal wskazują na niski odsetek przypadków listeriozy, ale wynikać to może z niedostatecznego stopnia rozpoznawalności choroby lub niskiej zgłaszalności przypadków leczonych w poszczególnych krajach. Posiadanie określonych markerów wirulencji jest czynnikiem decydującym o chorobotwórczości poszczególnych szczepów *L. monocytogenes*. Typowe geny charakteryzują niebezpieczne serotypy. choć nie wszystkie z nich są odpowiedzialne za rozwój choroby. Liczne doniesienia zgłaszane na przestrzeni ostatnich lat o zagrożeniu, wynikającym z obecności pałeczek *Listeria,* spowodowały wzrost zainteresowania naukowców i zwiększenie częstości badań w tym zakresie. Efektem jest opracowanie i wprowadzenie norm obejmujących podstawowe badania artykułów spożywczych. Pomimo, że żywność jest obecnie rutynowo badana pod kątem obecności tych bakterii, to żadne normy nie uwzględniają badania środowiska, w celu ograniczenia stopnia ich rozprzestrzeniania. Brak obowiązku kontroli nad rozpowszechnianiem tych bakterii w różnorodnych środowiskach, znacząco zwiększa możliwość pojawiania się dodatkowych zakażeń. Choć żywność jest głównym źródłem infekcji, to skażenie surowców pierwotnych jest bezpośrednio związane z bakteryjnym zanieczyszczeniem środowisk, z których są pozyskiwane. Aktualnie obowiązujące normy nie wymagają także oznaczania markerów wirulencji, ani przynależności bakterii do danego serotypu, choć takie podejście znacząco poszerzyłoby wiedzę na temat patogenności znanych i pozwoliło scharakteryzować właściwości, nowo odkrywanych gatunków, a także szczepów atypowych [45]. Monitorowanie patogenów wielolekoopornych izolowanych z żywności i środowiska naturalnego, mogłoby być pomocne również w identyfikacji wzorców oporności na antybiotyki [36]. Obecność *Listeria* w żywności niesie za sobą znaczne straty, nie tylko w sektorze zdrowotnym, ale i gospodarczym, gdzie może stać się przyczyną konieczności wycofywania zanieczyszczonych produktów z rynku, a w następstwie przyczynić się do utraty wiarygodności marki i zmniejszenia sprzedaży [4]. Dlatego tak ważny jest rozwój badań skupiających się na lepszym poznaniu cech patogenu i dróg jego rozprzestrzeniania. Powinno to znacząco ograniczyć częstość zachorowań na listeriozę i pozwolić zminimalizować straty wynikające z konieczności eliminacji tych bakterii z przemysłu żywieniowego oraz sektora zdrowotnego oraz dostarczyć wiedzy społeczeństwu na temat zagrożenia epidemiologicznego i konsekwencji wynikających z zakażenia.

Piśmiennictwo

1. Ademola O.O., Sphephile B.T.N., Ndumiso G.: Antimicrobial resistance and virulence signatures of *Listeria* and *Aeromonas* species recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa. *BMC Microbiol.* **15**, 1-10, DOI: 10.1186/s12866-015-0570-x (2015)
2. Adgamov R.R., Timchenko N.F., Zaitseva E.A., Pushkareva V.I., Kolbasov D.V., Egorva I.Y., Pukhovskaya N.M., Musatov Y.S., Ivanov L.I., Ermolaeva S.A.: Ecological and genetic mechanisms of development of epidemiologically significant strains of sapronosis causative agents. *Biology Bull.* **3**, 125–138 (2013)
3. Adzitey F., Ali G.R.R., Huda N., Cogan T., Corry J.: Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *Food Control*, **32**, 607–614 (2013)

4. Barre L., Angelidis A.S., Boussaid D., Brasseur E.D., Manso E., Besse N.G.: Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.* **238**, 281–287 (2016)
5. Bertsch D., Muelli M., Weller M., Uruty A., Lacroix Ch., Meile L.: Antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance gene transfer analysis of foodborne, clinical, and environmental *Listeria* spp. Isolates including *Listeria monocytogenes*. *Microbiologyopen*, **3**, 118–127 (2014)
6. Bortolussi R.: *Listeria monocytogenes* infections in Neonates. *Semin Pediatr Infect Dis*. **10**, 111–118 (1999)
7. Brouwer M.C., Beek D., Heckenberg S.G.B., Spanjaard L., de Gans J.: Community-Acquired *Listeria monocytogenes* Meningitis in Adults. *Clin. Infect. Dis*. **43**, 1233–1238 (2006)
8. Brugère-Picoux J.: Ovine listeriosis. *Small Ruminant Res*. **76**, 12–20 (2008)
9. Buchanan R.L., Gorri L.G.M., Hayman M.M., Jackson T.C., Whiting R.C.: A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, **75**, 1–13 (2017)
10. Chodorowska M., Kuklińska D.: Czynniki wirulencji *Listeria monocytogenes* oraz patogeneza, obraz kliniczny i antybiotykoterapia listeriozy. *Post. Mikrobiol*. **41**, 37–46 (2002)
11. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman B.: *Listeriaceae* (w) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, New York, 2009, s. 244–269
12. Delgado A.R.: Listeriosis in Pregnancy. *J. Midwifery Wom. Heal.* **53**, 255–259 (2008)
13. Dmowska K., Osek J.: Molekularne aspekty chorobotwórczości *Listeria monocytogenes*. *Med. Weter.* **66**, 236–241 (2010)
14. Doganay M.: Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol. Med. Mic*. **35**, 173–175 (2003)
15. Domenech E., Jimenez-Belenguer A., Amoros J.A., Ferrus M.A., Escriche I.: Prevalence and antimicrobial resistance of *L. monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food Control*, **47**, 120–125 (2015)
16. Doumith M., Cazalet C., Simoes N., Frangeul L., Jacquet C., Kunst F., Martin P., Cossart P., Glaser P., Buchrieser C.: New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* **72**, 1072–1083 (2004)
17. Espinoza-Gómez F., Newton-Sánchez O., Melnikov V., Pinzón L.: Peritonitis bacteriana espontánea por *Listeria monocytogenes*, en un paciente con cirrosis hepática. Caso clínico. *Rev. Med. Chile*, **134**, 1171–1174 (2006)
18. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, **14**, DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4634 (2016)
19. European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, **10**, DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2597 (2012)
20. European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, **11**, DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3129 (2013)
21. European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, **12**, DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3547 (2014)
22. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, **13**, DOI: 10.2903/j.efsa.2015.3991 (2015)
23. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, **13**, DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4329 (2015)
24. Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I.: The *Listeria* (w) Gram-Positive Pathogens. ASM Press, Washington, 2000, s. 471–507
25. Frye D.M., Zweig R., Sturgeon J., Tormey M., Le Cavalier M., Lee I., Lawani L., Mascola L.: An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Clin. Infect. Dis*. **35**, 943–949 (2002)
26. Gillespie S.H., Hawkey P.M.: *Listeria* and *Erysipelothrix* spp. (w) Principles and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition. John Wiley & Sons, Chichester, 2006, s. 129–139
27. Gliński Z., Kostro K.: Listerioza współczesnym zagrożeniem. *Życie weterynaryjne*, **87**, 577– 581 (2012)
28. Główny Inspektorat Sanitarny: Stan sanitarny kraju w roku 2015. Główny Inspektorat Sanitarny, Warszawa, 2016
29. Goldfine H., Shen H.: *Listeria monocytogenes*: Pathogenesis and Host Response. Springer, Nowy Jork, 2007
30. Gomez D., Azon E., Marco N., Carraminana J.J., Rota C., Arino A., Yanguela J.: Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.* **42**, 61–65 (2014)
31. Gründling A., Gonzalez M.D., Higgins D.E.: Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *J. Bacteriol.* **185**, 6295–6307 (2003)
32. Hirsh D.C., Zee Y.C.: Veterinary Microbiology. Blackwell Science Massachusetts, 1999
33. Hubálek Z., Rudolf I.: Family *Listeriaceae* (w) Microbial Zoonoses and Sapronoses, Springer, New York, 2011, s. 245–246
34. Ivanek R., Gröhn Y.T., Wells M.T., Lembo A.J., Sauders B.D., Wiedmann M.: Modeling of spatially referenced environmental and meteorological factors influencing the probablity of *Listeria* species isolation from natural environments. *Appl. Environ. Microb.***75**, 5893–5909 (2009)
35. Jagielski T., Osińska O.A., Bielecki J.: Molekularne determinanty wirulencji *Listeria monocytogenes* II. Czynniki wirulencji uczestniczące w wewnątrzkomórkowym etapie patogenezy: listeriolizyna O (LLO), fosfolipaza B (PLCB), metaloproteaza (MPL), fosfolipaza A (PLCA) i białko ACTA. *Post. Mikrobiol.* **45**, 303–331 (2006)
36. Jamali H., Paydar M., Ismail S., Looi Ch.Y., Wong W.F., Radmehr B., Abedini A.: Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fisch markets. *BMC Microbiol*. **15**, DOI: 10.1186/s12866-015-0476-7 (2015)
37. Jamali H., Radmehr B, Thong K.L.: Prevalence, charakterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control*, **34**, 121–125 (2013)
38. Jamali H., Thong K.L.: Genotypic charakterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods. *Food Control,* **44**, 1–6 (2014)
39. Jo E.K., Yuk J.M., Shin D.M., Sasakawa Ch.: Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. *Front. Immunol*. **4**, DOI: 10.3389/fimmu.2013.00097 (2013)
40. Jurkiewicz A., Oleszczak-Momot W.: *Listeria monocytogenes* jako problem zdrowia publicznego. *Medycyna Ogólna i Nauki o zdrowiu*, **21**, 29–32 (2015)
41. Khen B.K., Lynch O.A., Carroll J., McDowell D.A., Duffy G.: Occurrence, antibiotic resistance and molecular charakterization

of *Listeria monocytogenes* in the beef chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses Public Hlth*. **62**, 11–17 (2015)
42. Kołakowska A., Madajczak G.: Pałeczki *Listeria monocytogenes* w zakażeniach ludzi. *Przegl. Epidemiol.* **65**, 57–62 (2011)
43. Kwiatek K., Kukier E., Goldsztejn M.: Normy metodyczne w badaniach mikrobiologicznych łańcucha żywnościowego. *Życie Weterynaryjne*, **89**, 519–523 (2014)
44. López-Prieto M. D., Aller Garcíía A. I., Alcaraz Garcíía S., López Cepero J.: Liver abscess due to *Listeria monocytogenes*. *Clin. Microbiol. Infec.* **6**, 226–231 (2000)
45. Muskalska K.B., Szymczak B.: Postępy badań nad bakteriami rodzaju *Listeria. Post. Mikrobiol.* **54**, 123–132 (2015)
46. Nightingale K.K., Schukken Y.H., Nightingale C.R., Fortes E.D., Ho A.J., Her Z., Grohn Y.T., McDonough P.L., Wiedmann M.: Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microb*. **70**, 4458–4467 (2004)
47. Noordhout Ch. M., Devleesschauwer B., Angulo F., Verbeke G., Haagsma J., Kirk M, Havelaar A., Speybroeck N.: The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis*. **14**, 1073–1082 (2014)
48. Ooi S.T., Lorber B.: Gastroenteritis Due to *Listeria monocytogenes*. *Clin. Infect. Dis*. **40**, 1327–1332 (2005)
49. Orzyłowska-Śliwińska O.: Wróg czyha w lodówce. *Świat Nauki*, **236**, 21 (2011)
50. Osińska O.A., Jagielski T., Bielecki J.: Molekularne determinanty wirulencji *Listeria monocytogenes* I. Patogeneza listeryjna. Czynniki wirulencji: białka powierzchniowe uczestniczące w adhezji do komórek gospodarza. *Post. Mikrobiol.* **45**, 209–217 (2006)
51. Pérez R. F., Bañares R., Piqueras B., De Diego A., Castellote I., Casado M., García F.J., Cos E., Clemente G. Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Listeria monocytogenes. Revista Española de Enfermedades Digestivas*, **87**, 889–892 (1995)
52. Pillich H., Puri M., Chakraborty T.: ActA of *Listeria monocytogenes* and its manifold activities as an important listerial virulence factor. *The Actin Cytoskeleton and Bacterial Infection*, **399**, 113–132 (2016)
53. Quereda J.J., Meza-Torres J., Cossart P., Pizarro-Cerda J.: Listeriolysin S: A bacteriocin from epidemic *Listeria monocytogenes* strains that targets the gut microbiota. Gut Microbes, DOI: 10.1080/19490976.2017.1290759 (2017)
54. Roberts A.J., Wiedmann M.: Pathogen, host and environment al factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 904–918 (2003)
55. ROZPORZĄDZENIE (WE) Nr 183/2005 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 12 stycznia 2005 r. ustanawiające wymagania dotyczące higieny pasz
56. ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) Nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych
57. Ryser E.T., Marth E.H.: *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Third Edition. CRC Press, Boca Raton, 2007
58. Schlech W.F., Acheson D.: Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis*. **31**, 770–775 (2000)
59. Schoder D., Wagner M.: Growing awareness of asymptomatic carriage of *Listeria monocytogenes. Veterinary Medicine Austria*, **99**, 322–329 (2012)
60. Sedlák K., Tomšíčková M.: Niebezpieczne infekcje odzwierzęce. Wydawnictwo Bellona, Warszawa, 2007
61. Shi W., Qingping W., Jumei Z., Moutong Ch., Zean Y.: Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-to-eat foods in China. *Food Control*, **47**, 340–347 (2015)
62. Sim J.S., Kim M.J., Jung J.H., Kim H., Baek S.H., Sohn J.W., Yoon Y.K.: Nosocomical empyema caused by a rare serotype, serotype 4c, of *Listeria monocytogenes* in a patient with rheumatoid arthritis and chronic kidney disease: A case report and review of the literature. *J. Infec. Chemother*. **21**, 824–827 (2015)
63. Sip A.: Bakterie *Listeria monocytogenes*. Cz. I. Występowanie i źródła zanieczyszczenia żywności. *Przemysł spożywczy,* **64**, 40–43 (2010)
64. Toyoshima M.T.K., Apanavicius A., de Matos Soeiro A., de Almeida G.M.D., Arai M.H.: *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. *Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo*. **48**, 291–293 (2006)
65. Valckx W.J.A.R.M., Lutgens S.P.M., Haerkens-Arends H.E., Barneveld P.C., Beutler J.J., Hoogeveen E.K.: *Listeria* endocarditis: A diagnostic challenge. *J. Investig. Med. High Impact Case Rep*. **5**, DOI: 10.1177/2324709617698995 (2017)
66. Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domíngue-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J.: *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin. Microbiol. Rev*. **14**, 584–640 (2001)
67. Vijayakumar P.P., Muriana P.M.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat Meats Using Bacteriocin Mixtures Based on Mode-of-Action. *Foods,* 2017, **6**, DOI:10.3390/foods6030022 (2017)
68. Wang G., Qian W., Zhang X., Wang H., Ye K., Bai Y., Zhou G.: Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China. *Food Control*, **50**, 202–208 (2015)
69. Witter A.R., Okunnu B.M.,, Berg R.E..: The Essential role of Neutrophils during Infecions with the intracellular bacterial pathogen *Listeria monocytogenes. J. Immunol.* **197**, 1557–1565 (2016)
70. World Health Organization: Food and agriculture organization of the United Nations. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical Report, ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/y5394e/y5394e.pdf (14.08.2017)
71. Wurtzel O., Sesto N., Mellin J.R., Karunker I., Edelheit S., Becavin Ch., Archambaud C., Cossart P., Sorek R.: Comparative transcriptomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Mol. Sys. Biol.* **8**, DOI 10.1038/msb.2012.11 (2012)
72. Yeung P.S.M., Zagorski N., Marquis H.: The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* controls cell wall translocation of the broad-range phospholipase C. *J. Bacteriol.* **187**, 2601–2608 (2005)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 117–124
http://www.pm.microbiology.pl

ALICYCLOBACILLUS – BAKTERIE NADAL POZNAWANE

Justyna Dąbrowska[1], Alina Kunicka-Styczyńska[2]*

[1] Instytut Podstaw Chemii Żywności, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka
[2] Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka

Wpłynęło w grudniu 2017 r., zaakceptowano w marcu 2018 r.

Streszczenie: Rodzaj *Alicyclobacillus* obejmuje Gram-dodatnie, Gram-ujemne i Gram-zmienne, acydotermofilne bakterie przetrwalnikujące, izolowane z różnych środowisk, głównie z gleb kwasowych i geotermalnych, gorących źródeł, powierzchni owoców i zepsutych soków owocowych. Bakterie należące do rodzaju *Alicyclobacillus* charakteryzuje obecność ω-alicyklicznych kwasów tłuszczowych (ω-cykloheksylowych i ω-cykloheptylowych), izo- i anteizo-rozgałęzionych kwasów tłuszczowych oraz hopanoidów zlokalizowanych w błonach plazmatycznych. Dotychczas zidentyfikowano 23 gatunki oraz dwa podgatunki, wśród których najbardziej rozpowszechniony jest *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Niektóre gatunki stanowią zanieczyszczenia mikrobiologiczne żywności w przemyśle owocowo-warzywnym. Spory *Alicyclobacillus* sp. przeżywają temperatury pasteryzacji i są odporne na niskie pH. Spory bakterii ulegają aktywacji w podwyższonej temperaturze, co może prowadzić do namnażania się w sokach i w następstwie prowadzić do ich psucia. Rodzina *Alicyclobacillaceae* jest ciągle modyfikowana, a w rodzaju *Alicyclobacillus* przybywają nowe gatunki. Bakterie *A. acidoterrestris*, ze względu na szybką adaptację do zmieniających się warunków środowiska, uznano za mikroorganizmy o szybkim tempie ewolucji.

1. Wprowadzenie. 2. Wydzielenie taksonu *Alicyclobacillus* i pozycja systematyczna. 3. Charakterystyczne składniki błon komórkowych i ich funkcje. 4. Charakterystyka morfologiczna i fizjologiczna. 5. Wykrywanie bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus.* 6. Podsumowanie

***Alicyclobacillus* – bacteria still not understood**

Abstract: The genus *Alicyclobacillus* includes Gram-positive, Gram-negative or Gram-variable, acidothermophilic, endospore-forming bacteria, which have been isolated from various environments, mostly acidic and geothermal soils, hot springs, fruit surface and spoiled fruit juices. The members of the *Alicyclobacillus* genus are characterized by the presence of ω-alicyclic fatty acids (ω-cyclohexane or ω-cycloheptane), the iso and anteiso branched-chain fatty acids, and the hopanoids as the major membrane lipids. There are 23 known species and 2 subspecies, with *Alicyclobacillus acidoterrestris* as the most significant. Certain species cause food spoilage in the fruit-and-vegetable juices industry. The spores of *Alicyclobacillus* are highly tolerant to high temperatures and low pH-values of fruit juices. What is more, they are naturally present on fruit surface and can readily enter the production environment of the fruit and vegetable processing. Due to high thermophilicity of these bacteria, the typical juice pasteurization conditions can stimulate spore germination. This is the reason why they can proliferate in juice and ipso facto cause fruit products spoilage. The family of *Alicyclobacillaceae* has continuously been modified and each successive year brings new species. Additionally, *A. acidoterrestris* is recognized as bacterium with a high evolution rate due to its rapid adaptation to changing environmental conditions.

1. Introduction. 2. Taxonomic identification of *Alicyclobacillus* and its systematic position. 3. The characteristic components of cell membranes and their functions. 4. Morphological and physiological characteristics. 5. Detection of *Alicyclobacillus* bacteria, 6. Summary

Słowa kluczowe: *Alicyclobacillus*, bakterie acydofilne, bakterie termofilne
Key words: *Alicyclobacillus*, acidophilic bacteria, thermophilic bacteria

1. Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* stanowią nie tylko interesujący obiekt badań naukowych, ale są również jednym z mikroorganizmów szczególnie niepożądanych w gałęziach przemysłu spożywczego zajmujących się przetwórstwem owoców. Te acydotermofilne, przetrwalnikujące bakterie określane przez producentów koncentratów i soków owocowych jako „szkodniki" przeżywają niemal każdy proces produkcyjny [3]. Spory bakterii mogą ulegać aktywacji w czasie operacji technologicznych prowadzonych w podwyższonej temperaturze, co rodzi niebezpieczeństwo ich kiełkowania i kolonizacji linii technologicznej [7, 27]. Efektywną metodą ich usuwania wydaje się być ultrafiltracja, która stosowana w warunkach przemysłowych jest kosztowna ze względu na konieczność częstej wymiany membran filtracyjnych [28]. Opracowanie skutecznych i tanich technik niszczenia komórek i spor *Alicyclobacillus* spp. wymaga poznania etiologii zanieczyszczeń oraz dokładnej charakterystyki fizjologicznej, metabolicznej i genetycznej bakterii.

Do rodzaju *Alicyclobacillus* nadal włączane są nowe gatunki bakterii izolowanych zarówno ze środowisk ekstremalnych, jak i tych nie zaliczanych do szczególnie nieprzyjaznych dla rozwoju żywych organizmów. Ta szczególna różnorodność gatunków czyni ten rodzaj interesującym w aspekcie rozważań ewolucji adaptacyjnej. Bioróżnorodność *Alicyclobacillus* oraz skutki rozwoju tych bakterii w warunkach przemysłowych stały się motywem opracowania ich szczegółowej charakterystyki.

* Autor korespondencyjny: Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź; tel. 042 631 32 73; e-mail: alina.kunicka@p.lodz.pl

2. Wydzielenie taksonu *Alicyclobacillus* i pozycja systematyczna

Bakterie *Alicyclobacillus* zostały odkryte stosunkowo niedawno, a pierwsze raporty dokumentujące ich izolację i podające charakterystykę datowane są na lata 70. XX wieku [40]. Wówczas, w 1967 roku z gorących źródeł Tahoku w Japonii, wyizolowano trzy szczepy, które określono jako obligatoryjne termofile ściśle powiązane z *Bacillus coagulans*. Jednakże, izolaty te w porównaniu z *B. coagulans* wykazywały tolerancję na niższe pH (2,3–5,0, optimum 3,5–4,0) i zdolność do wzrostu w zakresie temperatur 45–71°C przy optimum 65°C, więc były wówczas jedynym znanym obligatoryjnie ciepłolubnym i kwasolubnym gatunkiem rodzaju *Bacillus*. Nie stwierdzono również znacznego podobieństwa izolatów do dobrze poznanych wówczas ciepłolubnych bakterii *Bacillus stearotermophilus* (obecnie reklasyfikowanych do rodzaju *Geobacillus*) [32].

Dalsze badania prowadzone w latach 70. przez Darlanda i Brock'a nad izolatami pozyskanymi ze środowisk naturalnych o niskim pH i wysokiej temperaturze doprowadziły do wprowadzenia nowego gatunku *Bacillus acidocaldarius* [8]. Wykazano bowiem, iż opisane izolaty charakteryzują się znacznie wyższym poziomem zawartości guaniny i cytozyny w materiale genetycznym (62–64% molowych G+C) [8], niż bakterie z rodzaju *Bacillus* o zawartości G+C równej 45–50% molowych. Wskazano również na znaczne podobieństwo pomiędzy izolatami pozyskanymi w 1967 r. i 1970 r. [8].

W kolejnych badaniach wskazano na obecność w błonie komórkowej bakterii *B. acidocaldarius* ω-alicyklicznych kwasów tłuszczowych, kwasów tłuszczowych izo i anteizo-rozgałęzionych [11, 12] oraz hopanoidów [18]. Kolejne izolacje *B. acidocaldarius* z termalnych kwaśnych środowisk sprawiły, że powstało przekonanie, iż gatunki *Bacillus* zawierające ω-alicykliczne kwasy tłuszczowe są ściśle powiązane ze środowiskiem wód termalnych. Jednak teza ta została obalona przez zespół Cerny'ego [5], gdy z soku jabłkowego wyizolowano bakterie z rodzaju *Bacillus*, zawierające kwasy ω-cykloheksanowe i hopanoidy [5]. Wyizolowany *Bacillus* został uznany za czynnik powodujący zepsucie i powiązany z *B. acidocaldarius* [5]. Bakterie przypominające szczepy opisane przez Cerny'ego [5] wyizolowano również z gleby [18], a ich relacja systematyczna została wyjaśniona w 1987 r., gdy stwierdzono, że obecność w błonie komórkowej kwasów ω-alicyklicznych nie jest specyficzna dla *B. acidocaldarius* [9]. W związku z tym, zaproponowano wprowadzenie nowego gatunku *Bacillus acidoterrestris* [9]. Cechą odróżniającą *B. acidoterrestris* od *B. acidocaldarius* jest zdolność do wykorzystania erytrytolu, sorbitolu i ksylitolu. Ponadto, nowo utworzony gatunek charakteryzuje się niższą zawartością G+C (51–53,1% molowych) oraz wzrostem w nieco mniejszym zakresie temperatur [7, 9]. W toku dalszych badań, wyizolowano z gleby tlenowe bakterie przetrwalnikujące zawierające ω-alicykliczne kwasy tłuszczowe, które były wyjątkowe pod tym względem, że zawierały kwas ω-cykloheptanowy [10]. Cecha ta odróżniała je od *B. acidocaldarius* i *B. acidoterrestris*, wytwarzających kwasy ω-cykloheksanowe. Zdefiniowano więc nowy gatunek *Bacillus cycloheptanicus*, który był ponadto obligatoryjnym auksotrofem wobec metioniny, izoleucyny i pantotenianu [10]. Analiza porównawcza sekwencji 16S rRNA tych trzech gatunków wykazała bardzo wysokie podobieństwo (98,8%) *B. acidocaldarius* i *B. acidoterrestris*. Podobieństwo pomiędzy *B. cycloheptanicus* a *B. acidocaldarius* i *B. acidoterrestris* było już nieco niższe (odpowiednio 93,2 i 92,7%) [43]. Równocześnie, stwierdzono ścisłe powiązanie tych trzech gatunków oraz ich odmienność od innych gatunków w rodzaju *Bacillus*. W rezultacie, Wisotzkey w 1992 roku zaproponował wprowadzenie nowego rodzaju *Alicyclobacillus* w rodzinie *Bacillaceae* [43], a nazwa taksonomiczna bakterii została zmieniona na *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* i *Alicyclobacillus cycloheptanicus*.

Obecnie, w skład rodziny *Alicyclobacillaceae* wchodzą także rodzaje *Kyrpidia*, *Tumebacillus* i *Effusibacillus*. Rodzaj *Kyrpidia* jako jednostka taksonomiczna został wprowadzony w 2012 roku, a jego przedstawicielem jest *Bacillus tusciae* [25]. Są to Gram-dodatnie, przetrwalnikujące bakterie termoacydofilne o zawartości G+C 59,1% molowych, nie zawierające w błonach komórkowych ω-alicyklicznych kwasów tłuszczowych. Rodzaj *Tumebacillus* obejmujący Gram-dodatnie, przetrwalnikujące, tlenowe bakterie zawierające w błonach komórkowych kwasy tłuszczowe izo-C15:0 i anteizo-C15:0 i genomie z udziałem 55,6% molowych G+C, został oficjalnie wprowadzony do taksonomii w 2008 roku [2, 37]. Wprowadzenie rodzaju *Effusibacillus* połączone zostało z reklasyfikacją dwóch gatunków *Alicyclobacillus*, w tym gatunku *Alicyclobacillus consociatus*, który został wyodrębniony w 2013 roku z próbki krwi 51-letniej laborantki [14] i podważał teorię niepatogenności tych bakterii.

Dotychczas opisano 23 gatunki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* oraz dwa podgatunki *A. acidocaldarius* [30]. Ostatnio opisanymi gatunkami rodzaju są *Alicyclobacillus tengchongensis* wyodrębniony w 2014 roku z gleb gorącego źródła Tengchong w Chinach [24], *Alicyclobacillus dauci* izolowany w 2015 roku z zepsutych soków owocowych i warzywnych o wyraźnym zapachu gwajakolu [31] oraz Gram-zmienne bakterie *Alicyclobacillus fodiniaquatilis* izolowane z kwaśnych wód kopalnianych [44].

3. Charakterystyczne składniki błon komórkowych i ich funkcja

Cechą charakterystyczną bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* jest zawartość w błonach komórkowych ω-alicyklicznych kwasów tłuszczowych, kwasów tłuszczowych izo i anteizo oraz hopanoidów. Są to związki typowe dla pierwszych 5 gatunków tworzących trzon rodzaju *Alicyclobacillus*. Włączony do rodzaju w 2003 roku gatunek *A. pomorum* nie zawierał kwasów ω-alicyklicznych i do 2007 roku był jedynym wyjątkowym pod tym względem przedstawicielem swego rodzaju. Od 2007 roku wprowadzono do rodzaju *Alicyclobacillus* aż 6 gatunków wytwarzających jedynie kwasy tłuszczowe izo i anteizo [14–16, 21, 22], a reguła obecności kwasów ω-alicyklicznych w komórkach bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* przestała być normą.

Konsekwentnie, w komórkach wszystkich bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* stwierdza się obecność kwasów tłuszczowych izo i anteizo metylo-rozgałęzionych, najczęściej zawierających od 15 do 18 atomów węgla w głównym łańcuchu. U większości gatunków znajdowano również kwasy tłuszczowe proste zawierające w łańcuchu od 14 do 18 atomów węgla.

ω-alicykliczne kwasy tłuszczowe obecne w błonach komórkowych bakterii *Alicyclobacillus* to kwasy ω-cykloheksylowe i ω-cykloheptylowe. Zawierają one odpowiednio ω-cykliczną grupę heksylową bądź heptylową połączoną z łańcuchem alkilowym, najczęściej o długości od 11 do 20 atomów węgla. ω-alicykliczne kwasy heksylowe występują u większości gatunków z rodzaju *Alicyclobacillus*, zaś ω-alicykliczne kwasy heptylowe są charakterystyczne jedynie dla trzech gatunków rodzaju, którymi są *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius* i *A. tengchongensis* [7, 15, 24]. Kwasy ω-alicykliczne występujące najczęściej u większości gatunków to kwas 17-cykloheksylopentadekanowy i kwas 19-cykloheksylononadekanowy.

Większość gatunków *Alicyclobacillus* ma wbudowane w błonę komórkową hopanoidy. Są to pentacykliczne triterpenoidy, które wspomagają płynność plazmalemmy, zwiększają jej sztywność i wytrzymałość oraz zmniejszają bierną dyfuzję jonów [35]. Wśród doniesień literaturowych można również odnaleźć informacje o sulfonolipidach w komórkach niektórych gatunków [43].

Obecnością w błonach komórkowych ω-alicyklicznych kwasów tłuszczowych, kwasów tłuszczowych izo i anteizo oraz hopanoidów tłumaczy się wyjątkową oporność bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* na wysokie temperatury i niskie pH [6]. Te komponenty błony komórkowej utrzymują odpowiednią strukturę warstwy fosfolipidów, przez co błona jest stabilna i bardziej wytrzymała. Ponadto, wykazano iż w błonach komórkowych bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*, których hodowle prowadzone są w wysokich temperaturach i przy niskim pH znajdują się w dużych ilościach ciasno upakowane kwasy ω-alicykliczne [7]. Wpływ kwasów ω-alicyklicznych na termo- i kwasooporność zasugerowano już w latach 70., gdy historia rodzaju *Alicyclobacillus* dopiero się kształtowała [12].

4. Charakterystyka morfologiczna i fizjologiczna

Komórki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* mają kształt prostych laseczek o zaokrąglonych końcach. Wyjątkiem są bakterie *A. tolerans* występujące w formie lekko zakrzywionych laseczek [23]. Bakterie *Alicyclobacillus* zazwyczaj występują pojedynczo, rzadziej tworzą ugrupowania. *A. acidocaldarius*, *A. cycloheptanicus* i *A. tolerans* tworzą krótkie łańcuszki [23, 43], natomiast *A. disulfidooxidans* występują pojedynczo, parami bądź w łańcuszkach [13].

Wielkość komórek waha się w granicach 0,9–6,0 μm długości i 0,3–1,1 μm szerokości (Tab. I). Wymiary komórek są zróżnicowane, w zależności od gatunku. Wszystkie gatunki *Alicyclobacillus* sp. są przetrwalnikujące i w niekorzystnych warunkach środowiskowych wykształcają wyjątkowo ciepłooporne i kwasooporne endospory. Przetrwalniki są owalne lub elipsoidalne, ułożone terminalnie bądź subterminalnie. U większości gatunków endospory powodują deformację komórki. Powszechnie uważa się, że do rodzaju *Alicyclobacillus* zaliczamy bakterie ruchliwe. Jednakże rodzaj ten zawiera także kilka gatunków, które nie wykazują zdolności ruchu. Procentowa molowa zawartość guaniny i cytozyny w genoforze bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* waha się w granicach 48,1–62,5 w zależności od gatunku (Tab. I) [15, 23, 29].

Do rodzaju *Alicyclobacillus* należą bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz Gram-dodatnie zdolne do wykazywania Gram-zmienności (Tab. II) [1, 29, 39]. Niektóre publikacje tłumaczą Gram-zmienność jako zdolność tych bakterii do bardzo szybkiego odbarwiania podczas barwienia Grama, co w efekcie powoduje trudność w wizualnej ocenie efektu barwienia [33]. Z kolei, inne publikacje opisują to zjawisko jako zależne od wieku komórki [6, 7, 34], wskazując na pojawianie się Gram-zmienności u starzejących się komórek. Wynika to z subtelnych różnic w budowie ściany komórkowej bakterii Gram-zmiennych, w porównaniu do bakterii Gram-dodatnich [4].

Wśród bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* można wyróżnić zarówno bakterie chemoorganotroficzne, wykorzystujące związki organiczne jako źródło węgla jak i nieliczne bakterie miksotroficzne wykorzystujące dodatkowo składniki nieorganiczne (Tab. II). Heterotroficzny typ odżywiania *Alicyclobacillus* sp. charakteryzuje się zdolnością do metabolizowania różnych związków bez wytwarzania gazów. Bakterie wykorzystują

Tabela I
Zestawienie cech różnicujących gatunki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*

Gatunek	Temperatura wzrostu (°C)		pH wzrostu		Zawartość G+C (% mol.)	Wielkość komórki dł. × szer. (μm)	Zdolność ruchu	Deformacja sporangium
	zakres	optimum	zakres	optimum				
A. acidocaldarius	45–70	63–65	2,0–6,0	3,0–4,0	60,3	2–3 × 0,7–0,8	+	–
A. acidoterrestris	35–55	42–53	2,2–5,8	4,0	52,2	2,9–4,3 × 0,9–1,0	+	+/–
A. cycloheptanicus	40–53	48	3,0–5,5	3,5–4,5	55,6	2,5–4,5 × 0,35–0,55	–	+
A. hesperidum	35–60	50–53	2,0–6,0	3,5–4,0	54,0	2,1–3,9 × 0,5–0,7	–	–
A. herbarius	35–65	55,6	3,0–6,5	4,5–5,0	56,2	bd	+	+
A. acidiphilus	20–55	50	2,5–5,5	3,0	54,1	4,8–6,3 × 0,9–1,1	+	+
A. pomorum	30–60	45–50	3,0–6,0	4,5–5,0	53,1	2,0–4,0 × 0,8–0,1	+	+
A. sendaiensis	40–65	55	2,5–6,5	5,5	62,3	2,0–3,0 × 0,8	–	+
A. vulcanalis	35–65	55	2,0–6,0	4,0	62,0	1,5–2,5 × 0,4–0,7	bd	bd
A. tolerans	20,55	37–42	1,5–5,0	2,5–2,7	48,1–49,3	3,0–6,0 × 0,9–1,0	–	+
A. disulfidooxidans	4–40	35	0,5–6,0	1,5–2,5	53,0	0,9–3,6 × 0,3–0,5	–	+
A. sacchari	30–55	45–50	2,0–6,5	4,0–4,5	56,6	4,0–5,0 × 0,6–0,7	+	+
A. shizuokensis	35–60	45–50	3,0–6,5	4,0–4,5	60,5	4,0–5,0 × 0,7–0,8	+	+
A. kakegawensis	40–60	50–55	3,0–6,5	4,0–4,5	61,3–61,7	4,0–5,0 × 0,6–0,7	+	+
A. macrosporangiidus	35–60	50–55	3,0–6,5	4,0–4,5	62,5	5,0–6,0 × 0,7–0,8	+	+
A. fastidiosus	20–55	40–45	2,0–5,5	4,0–4,5	53,9	4,0–5,0 × 0,9–1,0	–	+
A. contaminans	35–60	50–55	3,0–6,0	4,0–4,5	60,1–60,6	4,0–5,0 × 0,8–0,9	+	+
A. ferrooxydans	17–40	28	2,0–6,0	3,0	48,6	1,0–1,5 × 0,4–0,6	–	bd
A. aeris	25–35	30	2,0–6,0	3,5	51,2	1,5–2,5 × 0,4–0,6	+	bd
A. cellulosilyticus	40–67,5	55	3,5–6,5	4,5	60,8	2,0–6,0 × 0,5–0,8	–	bd
A. tengchongensis	30–50	45	2,0–6,0	3,2	53,7	2,0–3,5 × 0,5–0,7	+	+
A. dauci	20–50	40	3,0–6,0	4,0	49,6	2,0–5,0 × 0,5–0,7	–	bd
A. fodiniaquatilis	20–45	40	2,5–5,5	3,5	49,8–51,3	1,5–5,0 × 0,5–0,8	–	bd

Oznaczenia: + występuje, – nie występuje, +/– cecha zmienna, bd brak danych. Na podstawie: [7, 8, 13–15, 16, 21–24, 29, 31, 39, 43, 44].

przede wszystkim różnorodne węglowodany m.in. pentozy, heksozy, disacharydy i trisacharydy, a także alkohole wielowodorotlenowe, poliole, glikozydy, glukoniany, kwasy organiczne i aminokwasy [41]. Miksotrofizm wykazują *A. tolerans*, *A. disulfidooxidans*, *A. ferrooxydans, A. aeris* i *A. cellulosilyticus* [16, 22, 23, 29]. Są to fakultatywne chemoorganotrofy, które dostosowują wymagania pokarmowe do panujących warunków środowiska. W niesprzyjających warunkach zmieniają metabolizm z heterotroficznego na autotroficzny i prowadzą utlenianie głównie żelaza, siarki elementarnej, siarczków, pirytu, tetrasiarczanu i tiosiarczanu. Jednakże miksotrofy wykazują szybszy wzrost i większy przyrost biomasy w obecności jonów żelaza (II).

Z reguły, bakterie *Alicyclobacillus* sp. do wzrostu nie wymagają obecności dodatkowych czynników. Wyjątkiem są *A. cycloheptanicus*, auksotrofy zależne od metioniny (lub witaminy B12), pantotenianu i izoleucyny [41]. Z kolei, bakterie *A. disulfidooxidans* w warunkach laboratoryjnych wymagają suplementacji pożywki np. ekstraktem drożdżowym [13].

Bakterie *Alicyclobacillus* sp. są ściśle tlenowe (obligatoryjne aeroby) i wykazują zdolność wzrostu jedynie w obecności tlenu. Wyjątkami są nieliczne gatunki zaliczane do względnych beztlenowców (fakultatywne anaeroby). Typ oddychania tych bakterii jest uzależniony od warunków środowiskowych, jednak i one najlepiej rosną w warunkach tlenowych. Głównym chinonem izoprenoidowym w łańcuchu oddechowym bakterii *Alicyclobacillus* jest menachinon-7 (MK-7) [38].

Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* pod względem fizjologicznym i metabolicznym różnicuje m.in. zdolność do redukcji azotanów, wytwarzania indolu i acetoiny, zdolność do hydrolizy związków takich jak np. żelatyna, skrobia, eskulina, tyrozyna, fenyloalanina oraz obecność enzymów katalazy i oksydazy [41, 29]. Większość bakterii *Alicyclobacillus* sp. nie jest zdolna do redukcji azotanów, nie wytwarza oksydazy oraz indolu i acetoiny (Tab. II).

Charakterystycznymi metabolitami bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* są gwajakol i halofenole (2,6-dibromofenol i 2,6-dichlorofenol), powodujące

Tabela II
Zestawienie cech różnicujących gatunki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*

Gatunek	Obecność enzymów		Metabolity			Redukcja azotanów	Hydrolizowany substrat		Wynik barwienia Grama	Sposób odżywiania
	katalazy	oksydazy	gwajakol	indol	acetoina		skrobia	żelatyna		
A. acidocaldarius	+	–	+	–	+/–	–	+	+	dodatnie	heterotrofizm
A. acidoterrestris	+	–	+	–	+/–	–	+	–	zmienne	heterotrofizm
A. cycloheptanicus	+	+	+	bd	bd	–	–	–	dodatnie	heterotrofizm
A. hesperidum	+/–	–	+	bd	bd	–	+	+	dodatnie	heterotrofizm
A. herbarius	+	–	+	–	–	+	–	–	dodatnie	heterotrofizm
A. acidiphilus	+	–	+	–	+/–	–	–	–	dodatnie	heterotrofizm
A. pomorum	+	+	+	bd	bd	–	+	+	zmienne	heterotrofizm
A. sendaiensis	–	–	bd	+	+	+	bd	bd	ujemne	heterotrofizm
A. vulcanalis	–	–	bd	bd	bd	bd	bd	+	dodatnie	heterotrofizm
A. tolerans	+/–	+/–	bd	bd	bd	–	–	+	dodatnie	miksotrofizm
A. disulfidooxidans	–	–	bd	bd	bd	–	–	+	dodatnie	miksotrofizm
A. sacchari	–	–	–	–	–	–	+	+	zmienne	heterotrofizm
A. shizuokensis	+	–	–	–	–	–	–	–	zmienne	heterotrofizm
A. kakegawensis	+/–	–	–	–	–	+/–	–	–	zmienne	heterotrofizm
A. macrosporangiidus	+/–	–	–	–	–	–	–	–	zmienne	heterotrofizm
A. fastidiosus	+	–	–	–	–	+/–	+	–	zmienne	heterotrofizm
A. contaminans	–	–	–	–	–	+/–	+	–	zmienne	heterotrofizm
A. ferrooxydans	+	+	bd	+	–	–	–	+	dodatnie	miksotrofizm
A. aeris	–	–	bd	–	–	+	+	–	zmienne	miksotrofizm
A. cellulosilyticus	–	–	bd	–	–	–	–	–	ujemne	miksotrofizm
A. tengchongensis	+	–	bd	–	bd	–	+	+	dodatnie	bd
A. dauci	+	–	+	bd	bd	bd	bd	bd	zmienne	bd
A. fodiniaquatilis	–	–	bd	–	–	–	+/–	–	zmienne	bd

Oznaczenia: + występuje, – nie występuje, +/– zmienne, bd brak danych. Na podstawie: [7, 8, 13–15, 16, 21–24, 29, 31, 39, 43, 44].

nieprzyjemny zapach skażonych produktów. Gwajakol to związek organiczny z grupy fenoli (2-metoksyfenol), który powstaje w wyniku aktywności metabolicznej niektórych gatunków bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* [7, 26]. Nie wszystkie gatunki *Alicyclobacillus* sp. są zdolne do wytwarzania gwajakolu [6]. Gwajakol jest często tworzony przez te bakterie w sokach owocowych. W zepsutych produktach występuje nawet w 1000-krotnie wyższych stężeniach niż halofenole, a jego zapach określany jest jako słodki, dymny [26], medyczny, fenolowy [42], czy chemiczny [7]. Prekursorem gwajakolu w sokach jest kwas ferulowy, a także wanilina i kwas wanilinowy. Kwas ferulowy jest głównym składnikiem ligniny i obficie występuje w ścianach komórek roślinnych. Przy udziale enzymów bakteryjnych może być metabolizowany do waniliny i kwasu wanilinowego, które są następnie przekształcone do gwajakolu. Innym prekursorem gwajakolu jest tyrozyna, która w wysokim stężeniu występuje w soku jabłkowym [42]. Czynniki warunkujące produkcję gwajakolu to poziom namnożenia bakterii *Alicyclobacillus* sp., temperatura przechowywania i szok cieplny. Gwajakol zaczyna być wyczuwalny, gdy liczba komórek *A. acidoterrestris* osiąga poziom 10^5 jtk/ml w przypadku większości soków np. jabłkowego, pomarańczowego; bądź 10^4 jtk/ml w przypadku soku z białych winogron [26]. Skaza ta zazwyczaj jest wyczuwalna po 4 dniach przechowywania soków w temperaturze ok. 30°C. Szybkość produkcji gwajakolu przez *Alicyclobacillus* sp. wzrasta wraz ze wzrostem temperatury inkubacji. Ponadto, należy pamiętać, że związek ten wytwarzają komórki wegetatywne, a szok cieplny stymuluje kiełkowanie spor. Gwajakol jest bardzo łatwo wyczuwalny ze względu na niski próg wrażliwości sensorycznej. Stężenie progowe w wodzie wynosi 0,021 ppm w przypadku wrażliwości zapachowej i 0,013 ppm dla wrażliwości smakowej. Próg wrażliwości zapachowej w sokach wynosi około 2 ppb [17]. Gwajakol jest często wykorzystywany jako syntetyczny środek aromatyzujący do wytwarzania zapachu dymu, wędzenia i spalenizny. Zawdzięczamy mu

charakterystyczny zapach niektórych gatunków palonej kawy Arabica i słodu jęczmiennego [26]. Halofenole powodują powstawanie nieprzyjemnego zapachu określanego podobnie jak w przypadku gwajakolu jako dezynfekcyjny i medyczny. Jednakże obecność tych związków nie zawsze oznacza zanieczyszczenie mikrobiologiczne, a może świadczyć o zanieczyszczeniu chemicznym środkami dezynfekcyjnymi zawierającymi fenol i jego pochodne. Bakterie *A. acidoterrestris* są zdolne do wytwarzania halofenoli w sokach, ze względu na obecność haloperoksydaz – systemu enzymów przeprowadzających reakcję fluorowcowania [7]. Haloperoksydazy bakteryjne nie wymagają obecności kofaktorów, a prekursory fenolowe, nadtlenek wodoru oraz jony halogenków będące substratami reakcji są naturalnie obecne w sokach. Czynniki warunkujące produkcję halofenoli przez *Alicyclobacillus* sp. są takie same jak w przypadku gwajakolu, dodatkowo istotna jest objętość pomiędzy sokiem a opakowaniem. Im większa jest ta przestrzeń tym szybsza i intensywniejsza produkcja halofenoli [7].

5. Wykrywanie bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*

Do rutynowych metod izolacji bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* z zawiesiny gleby oraz napojów i soków zaliczamy filtrację membranową [6] oraz metodę DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique) [7]. Obecnie, jest to rutynowa metoda stosowana w kontroli jakości soków i koncentratów soków w zakładach produkcyjnych.

Ze względu na niski poziom zanieczyszczenia bakteriami *Alicyclobacillus* sp. przed wykonaniem posiewów stosuje się procedurę wstępnego wzbogacania [42]. W celu aktywacji przetrwalników wykonuje się szok termiczny (80°C, 10 minut) i próbki soków inkubuje się w temperaturze 40–50°C przez 48 h, a następnie posiewy na pożywki specyficzne dla tych bakterii.

Tradycyjne metody identyfikacji *Alicyclobacillus* obejmują standardowe testy morfologiczne i biochemiczne oraz wykrywanie obecności gwajakolu metodami chromatograficznymi np. chromatografii gazowej GC (Gas Chromatography) bądź wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Profil biochemiczny bakterii określa się za pomocą testów API 50CH [26].

Standardowa metoda hodowlana wykorzystywana do wykrywania bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* polega na inokulacji zawiesiny bakterii po szoku termicznym (80°C ± 1°) na bulion ziemniaczany PDB (Potato Dextrose Broth) o pH 3,5 i inkubacji w temperaturze 46°C przez 3 dni [6]. Następnie, wykonuje się posiew redukcyjny na pożywkę PDA (Potato Dextrose Agar) i inkubuje przez 2 dni w temperaturze 46°C. Etapem końcowym jest wykonanie testu potwierdzającego, który polega na przeniesieniu typowych kolonii na pożywkę PCA (Plate Count Agar) o pH 7,0 i inkubacji w temperaturze 46°C przez 3 dni. Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* nie wykazują zdolności do wzrostu na tej pożywce.

Inny sposób wykrywania *Alicyclobacillus* sp. nie obejmuje szoku termicznego i polega na wykonaniu posiewu próbki na pożywkę PDA o pH 3,5 i inkubacji w temperaturze 46°C przez 3 dni [6] oraz testów potwierdzających.

Test potwierdzający obecność bakterii *A. acidocaldarius* przeprowadza się z wykorzystaniem pożywki BAM (Bacillus Acidocaldarius Medium) z dodatkiem erytrytolu i błękitu bromofenolowego. Hodowlę prowadzi się przy pH 4,0 i w temperaturze 60°C przez 3 dni [6]. *A. acidocaldarius* na tej pożywce rośnie w postaci niebieskich kolonii. Popularnym testem potwierdzającym obecność *A. acidoterrestris* jest sprawdzenie zdolności wzrostu na pożywce OSA (Orange Serum Agar) o pH 4,0 oraz niezdolności wzrostu na pożywce OSA o pH 7,0 i wyższym [42].

Wykrywanie bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* zgodnie ze standardem IFU (International Federation of Fruit Juice Producers) w koncentratach soków i surowcach przebiega w kilku etapach [20]. Po homogenizacji w rozcieńczonej płynnej pożywce BAT lub YSG (1:10) próbki przeprowadza się szok temperaturowy (80°C ± 1°C, 10 minut). Następnie prowadzi się wstępne wzbogacanie, polegające na inkubacji próbki z pożywką w temperaturze 45 ± 1°C. Opcjonalnie, można również wykonać bezpośrednią inokulację próbki po szoku termicznym na zalecane pożywki bądź przeprowadzić jej filtrację przez filtr membranowy o wielkości porów 0,45 µm. Kolejnym etapem jest inokulacja na pożywkę agarową K agar (Kirin Agar) oraz BAT (Bacillus Acidoterrestris Thermophilic Agar) lub YSG (Yeast Starch Glucose Agar) i inkubacja w temperaturze 45 ± 1°C od 2 do 5 dni. Ostatnim etapem są testy potwierdzające. W tym celu wykonuje się sprawdzenie zdolności wzrostu bakterii w temperaturze 45 ± 1°C oraz 65 ± 1°C, a także na pożywce PCA, TSA (Tryptic Soy Agar) lub BHI (Brain Heart Infusion Agar) o pH 3,7 oraz 7,0. Dodatkowo, można wykonać test sprawdzający zdolność do produkcji gwajakolu z wykorzystaniem bulionu YSG zawierającego kwas wanilinowy (YSGVA, Yeast Starch Glucose Vanillic Acid).

Bakterie wytwarzające przetrwalniki podczas hodowli w temperaturze 45 ± 1°C na pożywkach o pH 3,7 oraz nie wykazujące wzrostu na pożywkach o pH powyżej 6 i podczas hodowli w temperaturze 65 ± 1°C to bakterie *Alicyclobacillus* [20]. Oceniając wyniki testu sprawdzającego zdolność do produkcji gwajakolu, należy uwzględnić fakt, iż nie wszystkie bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* są zdolne do wytwarzania gwajakolu.

Wykrywanie bakterii *Alicyclobacillus* sp. w sokach lub napojach owocowych polega na wstępnej preinkubacji oryginalnie zapakowanego produktu w temperaturze 45 ± 1°C przez 7 dni [20]. Następnie, zalecane jest wykonanie inokulacji preinkubowanego produktu na pożywkę agarową K agar oraz BAT lub YSG i inkubacji w temperaturze 45 ± 1°C przez 2–5 dni. Ostatnim etapem jest wykonanie testów potwierdzających.

Do szybkiej detekcji bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* powszechnie wykorzystuje się metody biofizyczne i metody biologii molekularnej, takie jak technika PCR (Polymerase Chain Reaction), Real Time PCR, RT-PCR (Reverse Transcription PCR), Taqman real-time PCR, sekwencjonowanie genu 16S rRNA, spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera FT-IR, analizę RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), sekwencjonowanie genu 16S rRNA oraz test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Najczęściej metody genetyczne opierają się na wykrywaniu charakterystycznych dla bakterii *Alicyclobacillus* sp. genów *SHC* kodującego enzym szlaku biosyntezy hopanoidów oraz VIT-*Alicyclobacillus* [19, 26]. Powyższe metody zapewniają jednoznaczną identyfikację, jednakże są kosztowne i pracochłonne i nie stanowią rutynowych procedur kontroli czystości mikrobiologicznej soków owocowych.

Powszechnie stosowaną metodą detekcji skażenia produktów owocowych przez *Alicyclobacillus* są testy na obecność gwajakolu, zarówno sensoryczne, jak i chemiczne [26]. Analiza sensoryczna najczęściej wykonywana jest z użyciem elektronicznego nosa. Procedury wykrywania gwajakolu zakładają zastosowanie metod fizykochemicznych m.in. GC-FID (Gas Chromatography with Flame Ionisation Detection), GC-O (Gas Chromatography with Olfactometry), GC-MS (Gas Chromatography with Mass Spectrometry), HPLC (High Performance Liquid Chromatography), LLE (Liquid-Liquid Extraction), SPE (Solid Phase Extraction), SPME (Solid Phase Microextraction), HS-SPME (Headspace Solid Phase Microextraction). Analiza chemiczna opiera się na spektrofotometrycznym pomiarze ($\lambda = 420$ nm) 3,3'-dimetoksy-4,4'-bifenochinonu, który powstaje w wyniku utlenienia gwajakolu przez peroksydazę w obecności nadtlenku wodoru. Obecnie dostępne są gotowe zestawy do identyfikacji gwajakolu opierające się na powyższej reakcji, które umożliwiają hodowlę mikroorganizmów w pożywkach YSG oraz BAT wzbogaconych w kwas wanilinowy (YSGVA, BATVA).

6. Podsumowanie

Rodzaj *Alicyclobacillus* zawiera niepatogenne, tlenowe, przetrwalnikujące bakterie, wytwarzające ω-alicykliczne kwasy tłuszczowe, hopanoidy oraz kwasy tłuszczowe izo i anteizo. Do rodzaju należą zarówno bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne jak i Gram-dodatnie z tendencją do Gram-zmienności. Na temat bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* nadal stosunkowo niewiele wiadomo. Rodzina *Alicyclobacillaceae* ciągle jest modyfikowana, a w rodzaju *Alicyclobacillus* przybywają nowe gatunki. Wysoce termooporne bakterie *Alicyclobacillus* sp. nie są deaktywowane w procesie standardowej pasteryzacji soków owocowych w niskim pH. Dodatkowo, bakterie *A. acidoterrestris* stanowiące powszechne zanieczyszczenia soków określono jako mikroorganizmy o szybkim tempie ewolucji, a tym samym szybkiej adaptacji do warunków środowiska. Niepokój budzi fakt, iż nie wdrożono skutecznej metody niszczenia tych bakterii w sokach owocowych. Jedyny dostępny i skuteczny sposób walki z *Alicyclobacillus* poprzez stosowanie konserwantów, nie jest akceptowany przez podążających w kierunku ekologicznego sposobu odżywiania konsumentów.

Piśmiennictwo

1. Alberice J.A., Funes-Huacca M.E., Guterres S.B., Carrilho E.: Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by saponin extracts combined with heat-treatment. *Int. J. Food Microbiol.* **159**, 130–135 (2012)
2. Baek S.-H., Cui Y., Kim S.-C., Cui C.-H., Yin C., Lee S.-T., Im W.-T.: *Tumebacillus ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 1715–1719 (2011)
3. Bahçeci K.S., Gokmen V., Serpen A., Acar J.: The effect of different technologies on *Alicyclobacillus acidoterrestris* during apple juice production. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 249–252 (2003)
4. Beveridge T.J.: Mechanism of gram variability in select bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 1609–1620 (1990)
5. Cerny G., Hennlich W., Poralla K.: Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterisation of the spoiling microorganism. *Z. Lebensm. Unters. For*. **179**, 224–227 (1984)
6. Chang S.-S.: Guaiacol producing *Alicyclobacillus* spp. – differentiation, detection, and control. Doctoral thesis, Washington State University, School of Food Science, 2008
7. Chang S.-S., Kang D.-H.: *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**, 55–74 (2004)
8. Darland G., Brock T.D.: *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **67**, 9–15 (1971)
9. Deinhard G., Blanz P., Poralla K., Altan E.: *Bacillus acidoterrestris* sp. nov.,a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst Appl Microbiol.* **10**, 47–53 (1987)
10. Deinhard G., Saar J., Krischke W., Poralla K.: *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing ω-cycloheptane fatty acids. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**, 68–73 (1987)
11. De Rosa M., Gambacorta A., Minale L.: Cyclohexane fatty acids from a thermophilic bacterium. *J. Chem. Soc. D.* **1**, 1334–1334 (1971)
12. De Rosa M., Gambacorta A., Bu'lock, J.D.: Effects of pH and temperature on the fatty acid composition of *Bacillus acidocaldarius*. *J. Bacteriol*. **117**, 212–214 (1974)
13. Dufresne S., Bousquet J., Boissinot M., Guay R.: *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing,

gram-positive, spore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 1056–1064 (1996)
14. Glaeser S.P., Falsen E., Martin K., Kampfer P.: *Alicyclobacillus consociatus* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3623–3627 (2013)
15. Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara M., Fujita R., An S.-Y., Kasai H., Yokota A.: Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* ssp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* ssp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1276–1285 (2007)
16. Guo X., You X.-Y., Liu L.-J., Zhang J.-Y., Liu S.-J., Jiang C.-Y.: *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous – and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2415–2420 (2009)
17. Groenewald W.H., Gouws, P.A., Witthuhn R.C.: Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores isolated from a fruit processing plant and grape juice concentrate in South Africa. *Afr. J. Microbiol. Res.* **7**, 2736–2740 (2013)
18. Hippchen B., Röll A., Poralla K.: Occurrence in soil of thermophilic bacilli possessing ω-cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Arch. Microbiol.* **129**, 53–55 (1981)
19. Huang X.-C., Yuan Y.-H., Guo C.-F., Gekas V., Yue T.-L.: *Alicyclobacillus* in the fruit juice industry: spoilage, detection, and prevention/control. *Food Rev. Int.* **31**, 91–124 (2015)
20. IFU Method on the Detection No. 12, International Federation of Fruit Juice Producers (2007)
21. Imperio T., Viti C., Marri L.: *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 221–225 (2008)
22. Jiang C.-Y., Liu Y., Liu Y.-Y., You X.-Y., Guo X.: *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrousoxidizing bacterium from solfataric soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2898–2903 (2008)
23. Karavaiko G.I., Bogdanova T.I., Tourova T.P., Kondrat'eva T.F., Tsaplina I.A., Egorova M.A., Krasil'nikova E.N., Zakharchuk M.L.: Reclassification of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. thermotolerans strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne *et al.*, 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 941–947 (2005)
24. Kim M.G., Lee J.-C., Park D.-J., Li W.-J., Kim C.-J.: *Alicyclobacillus tengchongensis* sp. nov., a thermo-acidophilic bacterium isolated from hot spring soil. *J. Microbiol.* **52**, 884–889 (2014)
25. Klenk H.-P., Eisen A.J. i wsp.: Complete genome sequence of the thermophilic, hydrogen-oxidizing *Bacillus tusciae* type strain (T2T) and reclassification in the new genus, *Kyrpidia* gen. nov. as *Kyrpidia tusciae* comb. nov. and emendation of the family *Alicyclobacillaceae* da Costa and Rainey, 2010. *Stand. Genomic Sci.* **5**, 121–134 (2011)
26. Kumar R., Bawa A.S., Kathiravan T., Nadanasabapathi S.: Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by non-thermal processing technologies – a Review. *IJAR.* **8**, 386–395 (2013)
27. Kunicka A.: Wykrywanie obecności mikroflory acidotermofilnej w sokach owocowych za pomocą systemu BacT/ALERT. *Aktualności bio/Merieux,* **33**, 21–23 (2005)
28. Kunicka-Styczyńska A.: Bakterie *Alicyclobacillus acidoterrestris* problem aktualny w przemyśle sokowniczym. *Przem. Spoż.* **63**, 34–37 (2009)
29. Kusube M., Sugihara A., Moriwaki Y., Ueoka T., Shimane Y., Minegishi H.: *Alicyclobacillus cellulosilyticus* sp. nov., a thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from steamed japanese cedar chips in lumbermill. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 2257–2263 (2014)
30. List of prokaryotic names with standing in nomenclature, www.bacterio.net/alicyclobacillus.html, 26.10.2017
31. Nakano C., Takahashi N., Tanaka N., Okada S.: *Alicyclobacillus dauci* sp. nov., a slightly thermophilic, acidophilic bacterium isolated from a spoiled mixed vegetable and fruit juice product. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 716–722 (2015)
32. Nazina T.N., Ivanov M.V. i wsp.: Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 433–446 (2001)
33. Sapers G.M., Gorny J.R., Yousef A.E.: Microbiology of fruits and vegetables. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, London, New York, 2006, s. 136–187
34. Satora P.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* – przetrwalnikująca bakteria skażająca soki. *Lab. Przem.* **5**, 20–24 (2009)
35. Seipke R.F., Loria R.: Hopanoids are not essential for growth of *Streptomyces scabies* 87–22. *J. Bacteriol.* **191**, 5216–5223 (2009)
36. Smit Y., Cameron M., Venter P., Witthuhn R.C.: *Alicyclobacillus* spoilage and isolation – A review. *Food Microbiol.* **28**, 331–349 (2011)
37. Steven B., Chen M.Q., Greer C.W., Whyte L.G., Niederberger T.D.: *Tumebacillus permanentifrigoris* gen. nov., sp. nov., an aerobic, spore-forming bacterium isolated from Canadian high Arctic permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1497–1501 (2008)
38. Tianli Y., Jiangbo Z., Yahong Y.: Spoilage by *Alicyclobacillus* bacteria in juice and beverage products: chemical, physical, and combined control methods. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **13**, 771–797 (2014)
39. Tsuruoka N., Isono Y., Shida O., Hemmi H., Nakayama T., Nishino T.: *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1081–1084 (2003)
40. Uchino F., Doi S.: Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agric. Biol. Chem.* **31**, 817–822 (1967)
41. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Fred A.R., Schleifer K.-H., Whitmann W.B.: Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 3. The Firmicutes. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2009, s. 229–243
42. Walker M., Phillips C.A.: *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry? *Int. J. Food Sci. Tech.* **43**, 250–260 (2008)
43. Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K.: Comparative sequence analyses on the 16s rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **42**, 263–269 (1992)
44. Zhang B., Wu Y.-F., Song J.-L., Huang Z.-S., Wang B.-J., Liu S.-J., Jiang C.-Y.: *Alicyclobacillus fodiniaquatilis* sp. nov., isolated from acid mine water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 4915–4920 (2015)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 125–137
http://www.pm.microbiology.pl

CELE, STRATEGIE I OCENA EFEKTYWNOŚCI BIOAUGMENTACJI OSADU CZYNNEGO ZDEFINIOWANYMI MIKROORGANIZMAMI W USUWANIU TOKSYCZNYCH ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH

Justyna Michalska*, Izabela Greń, Agnieszka Mrozik

Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w grudniu 2017 r.

Streszczenie: Technologia konwencjonalnego osadu czynnego stanowi obecnie jedną z najpowszechniej stosowanych metod w systemach biologicznego oczyszczania ścieków. Jej stosunkowo nową alternatywą jest technologia tlenowego granulowanego osadu czynnego, zapewniająca intensyfikację usuwania zanieczyszczeń i bardziej korzystna ekonomicznie. Współczesne oczyszczalnie ścieków coraz częściej bywają narażone na wysoki ładunek toksycznych i opornych na rozkład zanieczyszczeń chemicznych dopływających w ściekach. Mikroorganizmy naturalnie obecne w osadzie czynnym często nie są jednak zdolne do wykorzystywania tych złożonych związków chemicznych jako źródeł węgla i energii. Zastosowanie bioaugmentacji poprzez wprowadzenie do środowiska osadu czynnego wyselekcjonowanych szczepów lub konsorcjów mikroorganizmów, w celu wzmocnienia potencjału degradacyjnego mikroorganizmów autochtonicznych, wydaje się być atrakcyjnym rozwiązaniem problemów wielu oczyszczalni ścieków, związanych z ich narażeniem na wysokie stężenia ksenobiotyków. Jednakże aby strategia ta mogła stanowić skuteczne narzędzie wspomagające funkcjonowanie osadu czynnego, kluczowym aspektem jest dobór odpowiednich mikroorganizmów do inokulacji. Wybrane do bioaugmentacji mikroorganizmy powinny charakteryzować się nie tylko wysokim potencjałem degradacyjnym w kierunku rozkładu wybranych zanieczyszczeń, ale również odznaczać się zdolnością do chemotaksji, bioflokulacji, aggregacji, a także produkcji substancji egzopolisacharydowych, biosurfaktantów i autoinduktorów. Ponadto po wprowadzeniu do osadu czynnego powinny być one zdolne do wbudowywania się w strukturę kłaczków lub tworzenia granul. Bioaugmentacja osadu czynnego może być prowadzona z udziałem zarówno pojedynczych szczepów bakterii i grzybów, konsorcjów bakteryjnych i grzybowych, a także mieszanych konsorcjów mikroorganizmów. W oczyszczalniach ścieków wykorzystuje się natomiast w tym celu przede wszystkim komercyjnie dostępne preparaty handlowe. Mniej powszechna jest inokulacja osadu czynnego mikroorganizmami genetycznie modyfikowanymi, z obawy na ich niekontrolowany transfer do środowiska. Liczne badania wskazują, iż bioaugmentacja osadu czynnego może stanowić skuteczną strategię eliminacji związków ze ścieków toksycznych, takich jak fenol i jego pochodne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, barwniki, farmaceutyki i wiele innych.

Wprowadzenie. 2. Bioaugmentacja osadu czynnego. 3. Selekcja mikroorganizmów do bioaugmentacji osadu czynnego. 3.1. Pojedyncze szczepy bakterii. 3.2. Pojedyncze szczepy grzybów mikroskopowych. 3.3. Konsorcja mikroorganizmów. 3.4. Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie. 3.5. Biopreparaty handlowe. 4. Podsumowanie

Objectives, strategies and evaluation of the effectiveness of activated sludge bioaugmentation with defined microorganisms in the removal of toxic chemicals

Abstract: Among the currently used biological wastewater treatment systems, the conventional floccular-sludge method has been the most common. Its relatively novel alternative is aerobic granular activated sludge, which offers numerous operational and economic advantages. Although the activated sludge for modern wastewater treatment is often exposed to high concentrations of diverse chemicals, particularly inhibitory and recalcitrant ones, its autochthonous microorganisms may not be familiar with these compounds and can not use them as carbon and energy sources. For this reason, bioaugmentation, defined as a method for improvement of the degradative capacity of contaminated environment by adding selected strains or consortia of microorganisms, seems to be an attractive solution to overcome the problems associated with the exposure of sewage plants to high concentrations of xenobiotics. The most important step in the achievement of successful bioaugmentation is the selection of proper microorganisms with desirable abilities. They should be characterized by high degradative potential towards specific pollutant(s), ability to form biofilm, aggregation and production of extracellular polymeric substances, bioflocculating activity, motility, biosurfactants and autoinductors synthesis. Moreover, they should survive after inoculation into the activated sludge and possess the ability to incorporate into the flocs or form granules. In bioaugmentation of the activated sludge, several approaches can be distinguished – bioaugmentation with: single strains of bacteria or fungi, consortia of bacteria, consortia of fungi or mixed consortia, genetically modified microorganisms and commercial formulations. As many studies have indicated, bioaugmentation is an effective technology for eliminating from sewage toxic compounds, such as phenols and its derivatives, polycyclic aromatic hydrocarbons, dyes, pharmaceuticals and many others.

1. Introduction. 2. Bioaugmentation of activated sludge. 3. Selection of microorganisms for bioaugmentation of activated sludge. 3.1. Single strains of bacteria. 3.2. Single strains of filamentous fungi. 3.3. Consortia of microorganisms. 3.4. Genetically modified microorganisms. 3.5. Commercial formulations. 4. Summary

Słowa kluczowe: bioaugmentacja, mikroorganizmy, osad czynny, zanieczyszczenia
Key words: bioaugmentation, microorganisms, activated sludge, pollutants

* Autor korespondencyjny: Justyna Michalska, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 20 09 555; e-mail: jmichalska@us.edu.pl

Cele, strategie i ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych

1. Wprowadzenie

Gwałtowny przyrost liczby ludności oraz postępujące procesy urbanizacji i rozwoju przemysłu, jak również intensyfikacja rolnictwa przyczyniają się do znacznego wzrostu poziomu toksycznych substancji w ściekach. Związki te często odznaczają się wysoką trwałością, nie są podatne na rozkład biologiczny i w niskich stężeniach działają toksycznie na organizmy żywe. Narastające skażenie ścieków ksenobiotykami stanowi obecnie bardzo poważny problem środowiskowy nie tylko w Polsce, ale i na całym świecie [66].

Wśród substancji toksycznych, których stężenie w ściekach stale wzrasta, znajdują się przede wszystkim jednopierścieniowe węglowodory aromatyczne, w tym fenol i jego pochodne [6], benzen, etylobenzen oraz izomery ksylenu (BTEX) [12], wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), metale ciężkie [1], chloroform, cyjanek i tiocyjanian [45] oraz kwasy żywiczne [8]. Nową grupę zanieczyszczeń w ściekach, których stężenia systematycznie wzrastają stanowią farmaceutyki, w tym głównie antybiotyki, niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), betablokery, biomimetyki hormonalne oraz środki ochrony osobistej [44].

Obecnie wśród powszechnie stosowanych systemów biologicznego oczyszczania ścieków w warunkach tlenowych dominuje metoda konwencjonalnego osadu czynnego (KOC). W technologii tej zanieczyszczenia mineralizowane są przez różne grupy mikroorganizmów połączonych ze sobą w struktury, zwane kłaczkami [63]. Mikroorganizmy naturalnie występujące w osadzie czynnym często nie są zdolne do wykorzystywania toksycznych związków jako źródeł węgla i energii, zwłaszcza jeśli występują one w postaci złożonych mieszanin, i jednocześnie mogą być bardzo wrażliwe na ich ekspozycję. Prowadzi to do zaburzeń w funkcjonowaniu osadu, związanych z obniżeniem aktywności i bioróżnorodności mikroorganizmów oraz spadku liczebności pierwotniaków, istotnych dla prawidłowego funkcjonowania tego ekosystemu. W konsekwencji tych zjawisk może dojść do osłabienia, a nawet całkowitego zahamowania procesu biologicznego oczyszczania ścieków [5, 54]. Oczyszczanie ścieków bywa również utrudnione ze względu na wysoki ładunek toksycznych zanieczyszczeń, brak substancji biogennych, zmienną wartość odczynu pH, a także zasolenie [16, 67, 76]. Konwencjonalne oczyszczalnie ścieków często nie są przystosowane do eliminacji związków chemicznych o złożonej strukturze, dlatego też wiele z nich w niezmienionej postaci lub w formie równie toksycznych metabolitów pośrednich co związek wyjściowy przedostaje się do gleby, wód powierzchniowych i głębinowych [10, 14, 54].

Stosunkowo nowym i bardzo obiecującym rozwiązaniem zapewniającym intensyfikację usuwania zanieczyszczeń organicznych i substancji biogennych ze ścieków jest technologia tlenowego granulowanego osadu czynnego (TGOC) [50, 56, 62]. Osad granulowany ma postać agregatów powstających w wyniku samoimmobilizacji mikroorganizmów w określonych warunkach panujących w reaktorze. Granule osadu charakteryzują się lepszymi zdolnościami sedymentacyjnymi niż tradycyjny osad czynny w postaci kłaczków, co zapewnia wysokie stężenie biomasy w reaktorze. Ponadto granule w przeciwieństwie do kłaczków nie podlegają zjawisku pęcznienia, są bardziej odporne na duże wahania obciążenia i nierównomierność dopływu ścieków, zapewniają lepsze wykorzystanie rozpuszczalnego tlenu i znacznie ograniczają produkcję osadu nadmiernego. Dzięki zróżnicowanemu składowi gatunkowemu oraz zróżnicowanym warunkom tlenowym w strukturze granul, można uzyskać wysoką wydajność eliminacji zanieczyszczeń ze ścieków. Technologia TGOC ma udokumentowaną przewagę nad KOC i została wdrożona już w ponad 20 oczyszczalniach ścieków komunalnych i przemysłowych na świecie (m.in. w Portugalii, Holandii, Wielkiej Brytanii i Polsce) pod nazwą Technologii Nereda® [15, 36, 39]. Z uwagi na to, że nie do końca poznane są wszystkie mechanizmy warunkujące proces granulacji osadu, nadal trwają intensywne prace mające na celu poszukiwanie strategii przyspieszających proces tworzenia granul oraz zapewniających utrzymanie ich struktury w czasie ciągłej pracy reaktora.

Celem pracy było dokonanie przeglądu najnowszych osiągnieć w zakresie różnych strategii bioaugmentacji konwencjonalnego i granulowanego osadu czynnego wyselekcjonowanymi mikroorganizmami w eliminacji toksycznych związków chemicznych ze ścieków oraz ocena wydajności tego procesu.

2. Bioaugmentacja osadu czynnego

Atrakcyjne rozwiązanie problemów towarzyszących narażeniu wielu oczyszczalni ścieków na wysokie stężenia toksycznych zanieczyszczeń stanowi metoda bioaugmentacji [42, 48]. Polega ona na wprowadzeniu do środowiska osadu czynnego wyspecjalizowanych szczepów lub konsorcjów mikroorganizmów zdolnych do rozkładu złożonych związków chemicznych i zarazem opornych na ich wysokie stężenia, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia efektywności usuwania zanieczyszczeń ze ścieków [41, 54]. Mikroorganizmy o pożądanych cechach degradacyjnych pozyskuje się do bioaugmentacji poprzez ich selekcję z tego samego

lub innego źródła o identycznym lub podobnym typie zanieczyszczeń, a następnie namnaża się je w warunkach laboratoryjnych [10, 46, 76, 82]. Do skażonego osadu czynnego można również introdukować mikroorganizmy genetycznie modyfikowane o wzmożonej aktywności degradacyjnej względem konkretnego związku [4]. Inną strategią jest stosowanie do bioaugmentacji komercyjnych biopreparatów, zawierających zdefiniowane konsorcja mikroorganizmów i/lub enzymy czy biosurfaktanty. Wprowadzenie wyselekcjonowanych mikroorganizmów do osadu czynnego może nie tylko wspomagać eliminację trudno rozkładalnych zanieczyszczeń ze ścieków, ale również usprawniać proces usuwania związków azotu i fosforu oraz poprawiać właściwości flokulacyjne osadu [17, 37].

Aplikacyjne wykorzystanie bioaugmentacji w osadzie czynnym nie jest powszechne, ze względu na trudny do przewidzenia los mikroorganizmów inokulowanych do tego środowiska. Introdukowane do osadu bakterie są podatne na wpływ różnych czynników, między innymi na żerowanie pierwotniaków, wymywanie wraz ze ściekami i złożone interakcje z mikroorganizmami autochtonicznymi [3, 27, 49, 78, 79]. Aby metoda bioaugmentacji mogła stanowić skuteczne narzędzie w zwiększaniu efektywności usuwania zanieczyszczeń i wspomagające funkcjonowanie osadu czynnego, kluczowym aspektem jest dobór odpowiednich mikroorganizmów do inokulacji.

3. Selekcja mikroorganizmów do bioaugmentacji osadu czynnego

Etap selekcji drobnoustrojów o potencjalnym znaczeniu w bioaugmentacji osadu czynnego polega na zbadaniu i ocenie ich potencjału degradacyjnego w kierunku rozkładu wybranych zanieczyszczeń. Równie istotna jest charakterystyka wyselekcjonowanych mikroorganizmów pod kątem cech pozwalających na ich inkorporację w strukturę kłaczków i granul, co zapewnia im ochronę przed atakiem pierwotniaków, ułatwia pobieranie substancji odżywczych i pozwala na egzystencję w tym ekosystemie. Wybrane do bioaugmentacji szczepy bakterii powinny cechować się zdolnościami do agregacji i adhezji, odgrywającymi kluczową rolę w procesie formowania kłaczków i granul [53]. Badania Liu i wsp. [37] wskazują na przykład, że zdolność do agregacji szczepu *Rhizobium* sp. NJUST 18 inokulowanego do sekwencyjnego reaktora biologicznego (SBR) istotnie wpłynęła na poprawę procesu granulacji osadu czynnego. Podobnie Monsalvo i wsp. [46] stwierdzili, że szczep *Pseudomonas putida* inokulowany do osadu czynnego obciążonego 4-chlorofenolem (4-CP) przeżywał w nim przez okres trzech miesięcy, co wynikało z jego zdolności do tworzenia agregatów w obecności 4-CP oraz zmiany morfologii komórek z formy wydłużonej (*bacillus*) na formę kulistą (*coccus*).

Inną pożądaną cechą mikroorganizmów stosowanych w bioaugmentacji osadu czynnego są ich zdolności do produkcji macierzy egzopolisacharydowej (EPS), otaczającej komórki bakterii [64]. Wydzielanie substancji polisacharydowych przez mikroorganizmy nie tylko wspomaga wzajemną agregację komórek, wpływając na ich fizykochemiczne właściwości (strukturę, ładunek powierzchniowy, zdolność do flokulacji i adsorpcji), ale także chroni je przed czynnikami środowiskowymi, np. żerowaniem pierwotniaków, związkami antymikrobiologicznymi, biocydami oraz wysokimi stężeniami toksycznych substancji [52]. Obecne w strukturze macierzy egzopolisacharydowej regiony hydrofobowe i liczne anionowe grupy funkcyjne (np. karboksylowe, fosforylowe, sulfhydrylowe, fenylowe i hydroksylowe) pośredniczą nie tylko w akumulacji składników odżywczych, ale także znajdujących się w ściekach zanieczyszczeń, w tym metali ciężkich [47, 65]. Gupta i Thakur [19] udowodnili doświadczalnie, że skuteczność usuwania zanieczyszczeń ze ścieków inokulowanych szczepem *Bacillus* sp. ISTVK1 była związana między innymi z jego zdolnością do wytwarzania dużej ilości polimerów zewnątrzkomórkowych.

Zdolność mikroorganizmów do komunikowania się ze sobą poprzez wydzielanie do otoczenia i rozpoznawanie cząsteczek sygnałowych, tzw. autoinduktorów, znana pod nazwą quorum sensing jest równie ważną cechą przy doborze szczepów do inokulacji osadu. Bakterie rozpoznając precyzyjnie naturę chemiczną autoinduktorów oraz ich progowe stężenie (wartość *quorum*) w środowisku wzrostu, są w stanie reagować na zachodzące w nim zmiany poprzez indukcję ekspresji odpowiednich genów, kontrolujących ważne szlaki metaboliczne i określone procesy życiowe. W ten sposób mikroorganizmy mogą monitorować liczbę komórek oraz aktywność fizjologiczną całej populacji [80]. Zdolność mikroorganizmów do wydzielania autoinduktorów może wspomagać ich międzykomórkową komunikację z mikroorganizmami naturalnie występującymi w osadzie i w ten sposób umożliwiać skuteczne jego zasiedlanie. Wang i wsp. [73] wykazali, że szczep *Acinetobacter* sp. TW był zdolny do inkorporacji w strukturę KOC, obciążonego ściekami z przemysłu tytoniowego, dzięki produkcji krótkołańcuchowych acylowanych laktonów homoseryny (AHLs). Natomiast wydzielane przez bakterie do środowiska wzrostu AHLs z długim łańcuchem bocznym, były odpowiedzialne za ochronę komórek przed toksycznym działaniem obecnej w ściekach nikotyny.

Zdolność mikroorganizmów do chemotaksji odgrywa także istotną rolę w procesie oczyszczania ścieków. Rozpoznanie przez drobnoustroje gradientu stężenia

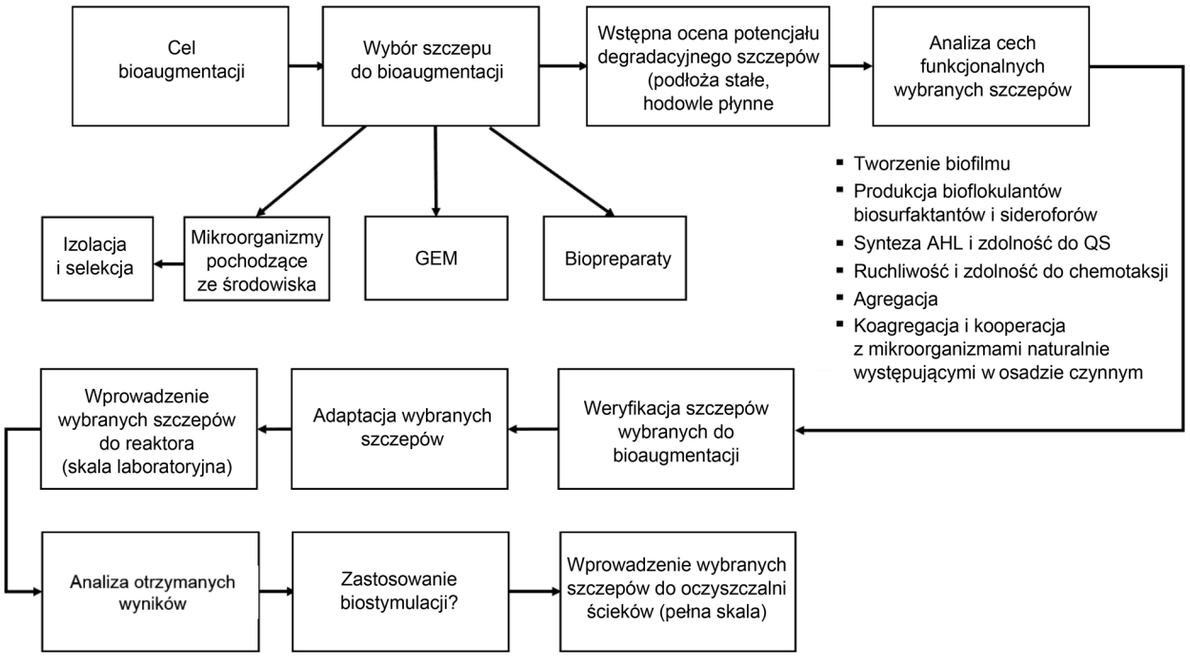
substancji chemicznych obecnych w ściekach wyzwala kaskadę przekazywania sygnału molekularnego, wpływając na modulowanie aktywności wici oraz ruchu bakterii w kierunku cząsteczek (atraktantów), odpowiedzialnych za stymulację tych procesów lub z dala od nich (repelentów). Chemotaksja może zatem wspomagać biodegradację zanieczyszczeń w ściekach lub stanowić mechanizm chroniący mikroorganizmy przed toksycznym wpływem ksenobiotyków, pozwalając im na przemieszczenie się do miejsc, gdzie panują bardziej sprzyjające warunki wzrostu. Ponadto mechanizm ten może wspomagać współzawodnictwo zdolnych do ruchu mikroorganizmów z innymi drobnoustrojami obecnymi w osadzie czynnym [9].

Ze względu na fakt, że mikrobiologiczny rozkład wielu ksenobiotyków może być utrudniony z powodu ich hydrofobowego charakteru i tym samym ograniczonej dostępności dla komórek mikroorganizmów, pożądaną cechą inokulantów do bioaugmentacji jest ich zdolność do syntezy związków powierzchniowo czynnych, zwanych biosurfaktantami. Związki te obniżają napięcie powierzchniowe oraz międzyfazowe, zwiększając w ten sposób powierzchnię zanieczyszczenia dostępną dla drobnoustrojów [8, 18]. Cirja i wsp. [10] wykazali, że wzrost wydajności rozkładu nonylofenolu (NF) w KOC wynikał ze zdolności inokulowanego szczepu *Sphingomonas* sp. TTNP3 do produkcji biosurfaktantów. Podobnie Chen i wsp. [8] wiązali wzrost poziomu usuwania związków żywicznych ze ścieków ze zdolnością szczepu *Gordonia* JW8 do produkcji biosurfaktantów i kwasów mikolowych.

Ważną cechą mikroorganizmów wyselekcjonowanych do bioaugmentacji osadu czynnego jest zdolność do syntezy związków polimerowych, tzw. bioflokulantów, wspomagających agregację komórek, a także immobilizację zanieczyszczeń zawieszonych w roztworze. Wprowadzanie do osadu czynnego takich mikroorganizmów może wpływać na skrócenie czasu jego granulacji oraz powstawanie bardziej stabilnych kłaczków. Potwierdzeniem tego zjawiska są wyniki badań Song'a i wsp. [69], którzy przeprowadzili w skali laboratoryjnej bioaugmentację KOC konsorcjum bakteryjnym złożonym ze szczepów *Devosia hwasunensis* i *Tetrasphaera elongata*, produkujących bioflokulanty. Guo i wsp. [17] wykazali także, że związki bioflokulujące syntetyzowane przez wprowadzone do oczyszczalni ścieków szczepy *Bacillu*s sp. F2 i F6 przyczyniły się do wzrostu w tym środowisku bakterii z rodzaju *Zooglea*, odpowiedzialnych za spójność kłaczków, oraz poprawiły zdolności flokulacyjne osadu. Etapy selekcji mikroorganizmów oraz strategie bioaugmentacji osadu czynnego ilustruje rys. 1.

3.1. Pojedyncze szczepy bakterii

W ciągu ostatnich kilku lat przeprowadzono wiele badań dotyczących intensyfikacji rozkładu związków fenolowych, WWA, barwników, farmaceutyków, pestycydów czy związków ropopochodnych przez KOC i TOGC z wykorzystaniem pojedynczych szczepów bakterii (Tabela I). Xenofontos i wsp. [76] po inokulacji KOC, obciążonego 4-metylofenolem (4-MF) (750 mg/l), alkalofilnym szczepem *Advenella* sp. LVX4



Rys. 1. Etapy selekcji mikroorganizmów oraz strategie bioaugmentacji osadu czynnego
AHL – acyowane laktony homoseryny, QS – quorum sensing, GEM – genetycznie modyfikowane mikroorganizmy (opracowanie własne).

Tabela I
Pojedyncze szczepy bakterii w bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego toksycznymi związkami chemicznymi w skali laboratoryjnej

Mikroorganizm	Źródło pochodzenia	Związek, mg/l	Ścieki/Podłoże/Rodzaj osadu	Źródło
Comamonas testosteroni bdq06	oczyszczalnia ścieków przemysłowych, Chiny	fenol, 290 chinolina, 316	ścieki z przemysłu farbiarskiego: ścieki komunalne (v/v; 1:2; 1:1; 2:1); KOC	[38]
Advenella sp. LVX4	gleba skażona olejem napędowym, Cypr	4-metylofenol, 750	podłoże mineralne; KOC	[76]
Streptomyces sp. QWE-35	oczyszczalnia ścieków z przeróbki węgla, Chiny	naftalen, 38,2	ścieki surowe; KOC	[77]
Paracoccus denitrificans W12	oczyszczalnia ścieków komunalnych, Chiny	pirydyna, 250–500	ścieki z przemysłu farmaceutycznego; KOC	[75]
Bacillus cereus HWBI	gleba skażona poliakrylamidem, Chiny	poliakrylamid, 100	podłoże mineralne; KOC	[74]
Pseudomonas putida CECT 4064	kolekcja szczepów, Hiszpania	fenol, 80–150 4-chlorofenol, 50	ścieki syntetyczne; KOC	[46]
Pseudomonas sp. JY2	oczyszczalnia ścieków petrochemicznych, Chiny	fenol, 550	podłoże mineralne, pH 10; KOC	[58]
Pseudomonas putida ONBA-17	oczyszczalnia ścieków komunalnych, Chiny	4-nitrobenzaldehyd, 100	ścieki syntetyczne; KOC	[79]
Sphingomonas sp. TTNP3	osad czynny, Belgia	nonylofenol, 0,220	ścieki syntetyczne; KOC	[10]
Exiguobacterium sp.	gleba z okolic fabryki farmaceutycznej, Chiny	Brilliant Scarlet GR, 700–1000	ścieki syntetyczne; KOC	[82]
Pseudomonas sp. HF-1	gleba skażona ściekami z przemysłu tytoniowego, Chiny	nikotyna, 40–250	ścieki z przemysłu tytoniowego: woda wodociągowa (v/v; 7:100); KOC	[72]
Rhodococcus sp. FP1	gleba skażona odciekamiz przemysłu chemicznego, Portugalia	2-fluorofenol, 9–19	ścieki syntetyczne; TGOC	[12]
Achromobacter sp. QXH	mieszanina gleby i osadu czynnego	kwas 2,4-fenoksyoctowy, 144 i 565	ścieki syntetyczne bez dodatku lub z dodatkiem glukozy; TGOC	[60]

Objaśnienia: KOC – konwencjonalny osad czynny, TGOC – tlenowy granulowany osad czynny

stwierdzili całkowity rozkład tego związku w ciągu około 100 godzin. Natomiast mikroorganizmy w osadzie niebioaugmentowanym były zdolne do degradacji jedynie 44% wyjściowej dawki 4-MF. W innych badaniach Qu i wsp. [58] w wyniku bioaugmentacji KOC, silnie skażonego zasadowymi ściekami fenolowymi, z użyciem alkalofilnego szczepu *Pseudomonas* sp. JY2 wykazali, że obecność introdukowanych bakterii korespondowała ze wzrostem tempa usuwania hydroksybenzenu ze ścieków oraz poprawą zdolności flokulacyjnych osadu. W osadzie poddanym bioaugmentacji ubytek wyjściowego stężenia fenolu (550 mg/l) w ciągu 36 godzin wynosił 95%, natomiast w osadzie niebioaugmentownym w tym samym czasie biodegradacji uległo 45% tego związku. Zakończoną sukcesem bioaugmentację KOC skażonego nonylofenolem (NF) (0,22 mg/l) z użyciem szczepu *Sphingomonas* sp. TTNP3 przeprowadzili także Cirja i wsp. [10]. Efektem wprowadzenia tej bakterii do środowiska osadu był nie tylko wzrost szybkości rozkładu NF w ściekach, ale również zmiana sposobu jego degradacji. Rozkładowi NF w osadzie poddanym bioaugmentacji towarzyszyło pojawienie się tylko jednego, nieszkodliwego metabolitu pośredniego – hydrochinonu, natomiast w osadzie nieinokulowanym rozkład tego związku przebiegał z wytworzeniem mieszaniny różnych intermediatów o skróconych lub utlenionych łańcuchach alkilowych, wykazujących strukturalne podobieństwo do NF i mogących, podobnie jak on, wywoływać zaburzenia w funkcjonowaniu układu endokrynnego organizmów żywych.

Jednym ze związków aromatycznych, którego stężenie w ściekach nie podlega żadnej kontroli jest *o*-nitrobenzaldehyd (ONBA), stosowany w syntezie wielu związków chemicznych, w tym barwnika indygo oraz leku nifedypiny. Aby zbadać potencjalne zdolności szczepu *P. putida* ONBA-17 (znakowanego genem *gfp*) do rozkładu tego związku, Yu i wsp. [79] przeprowadzili bioaugmentację KOC obciążonego ONBA (100 mg/l). Stwierdzili istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy wzrostem wprowadzonej bakterii a szybkością rozkładu tego związku. Całkowitą mineralizację ONBA w osadzie czynnym inokulowanym badanym szczepem uzyskali w ciągu 8 dni, natomiast dla porównania w osadzie kontrolnym, niepoddanym bioaugmentacji, w tym samym czasie rozkładowi uległo 24% początkowego stężenia tego związku. Introdukcja szczepu

P. putida ONBA-17 do osadu czynnego wpłynęła także na zwiększenie szybkości usuwania innych zanieczyszczeń organicznych ze ścieków.

Coraz częściej w ściekach wykrywa się obecność toksycznych, teratogennych oraz będących źródłem odoru N-heterocyklicznych związków aromatycznych, takich jak pirydyna, chinolina oraz ich pochodne. Często towarzyszą im również dimetyloformamid, alkohol 4-metoksybenzylowy, toluen, izopropanol oraz dichlorometan. Substancje te używane są do produkcji rozpuszczalników oraz środków farmaceutycznych lub powstają jako produkty uboczne przemysłu chemicznego i farmaceutycznego. Proces degradacji pirydyny (384 mg/l) w KOC obciążonym ściekami farmaceutycznymi i inokulowanym szczepem *Paracoccus denitrificans* W12 badali Wen i wsp. [75]. W ciągu 15 dni uzyskali prawie całkowitą mineralizację (97%) wyjściowego stężenia pirydyny w osadzie bioaugmentowanym bakteriami, podczas gdy w osadzie kontrolnym w tym czasie rozkładowi uległo 85% wprowadzonej dawki związku. Ponadto stwierdzili, że wyraźna dominacja szczepu *P. denitrificans* w bioaugmentowanym osadzie zmniejszała się wraz ze spadkiem stężenia pirydyny w ściekach i był on zastępowany przez bardziej wrażliwe na wysokie stężenia tego związku bakterie z rodzajów *Sphingobium, Comamonas* oraz *Hyphomicrobium*. W innych badaniach Liu i wsp. [38] bioaugmentowali KOC obciążony ściekami, pochodzącymi z przemysłu farbiarskiego, allochtonicznym szczepem *Comamonas testosteroni* bdq06 o wysokim potencjale degradacji fenolu oraz chinoliny. Wykazali, że w osadzie bioaugmentowanym nastąpił całkowity rozkład obu tych związków, pomimo wzrostu obciążenia ścieków ładunkiem fenolu oraz chinoliny, odpowiednio z 100,2 do 153,2 mg/l oraz z 108,1 do 216,5 mg/l. W tym samym czasie w osadzie nieinokulowanym mineralizacji uległo 73–85% chinoliny oraz 82–95% fenolu. Dodatkowo obecność inokulanta w osadzie przyczyniła się do zwiększenia efektywności usuwania całkowitego węgla organicznego (CWO) ze ścieków i wpłynęła istotnie na wzrost bioróżnorodności mikroorganizmów. Chen i wsp. [8] po wprowadzeniu do reaktora SBR, obciążonego ściekami z papierni, szczepu *Gordonia* sp. JW8 zaobserwowali wzrost szybkości usuwania ChZT o 5% w stosunku do warunków kontrolnych. Podobnie Wang i wsp. [72] wykazali, że bioaugmentacja KOC, obciążonego ściekami z przemysłu tytoniowego, szczepem *Pseudomonas* sp. HF-1 przyczyniła się do uzyskania całkowitego rozkładu obecnej w ściekach nikotyny oraz prowadziła do wzrostu usunięcia ChZT z 84% do 91% w ciągu czterech kolejnych cykli pracy reaktora. Dla porównania wartość tego parametru w osadzie nieinokulowanym spadła w tym czasie z 90% do 65%.

Wzmożona produkcja przemysłowa przyczynia się także do gwałtownego wzrostu zanieczyszczenia ścieków WWA. Xu i wsp. [77] przeprowadzili skuteczną bioaugmentację KOC szczepem *Streptomyces* sp. QWE-35, zdolnym do rozkładu naftalenu. W ciągu 10 dni uzyskali o 36% wyższą redukcję wyjściowego stężenia tego związku w porównaniu do jego rozkładu w osadzie kontrolnym.

W wyniku stosowania w procesie oczyszczania ścieków środków flokulujących, w osadzie czynnym mogą pojawiać się syntetyczne, odporne na rozkład mikrobiologiczny polimery, jak np. poliakrylamid (PAM). Wen i wsp. [74] wykazali, że wprowadzenie do KOC skażonego PAM (100 mg/l) szczepu *Bacillus cereus* HWBI, zdolnego do rozkładu tego polimeru, zwiększyło stopień jego eliminacji, odpowiednio o 30 i 70% w reaktorze SBR i kontaktowym reaktorze oksydacyjnym (COR).

Z przeglądu literatury wynika, że bioaugmentacja TGOC jest również skuteczna w usuwaniu toksycznych zanieczyszczeń ze ścieków. Duque i wsp. [12] wykazali na przykład, że inokulacja TGOC w reaktorze SBR szczepem *Rhodococcus* sp. FP1, zdolnym do rozkładu 2-fluorofenolu (2-FF), skutkowała eliminacją FF ze ścieków w stężeniu 9–19 mg/l. Natomiast TGOC niepoddany bioaugmentacji nie był zdolny do mineralizacji FF. Na podstawie analiz genetycznych stwierdzono ponadto, że inokulowany szczep FP1 obecny był w granulach osadu w czasie 444 dni pracy reaktora. W innych badaniach Quan i wsp. [60] udowodnili, że bioaugmentacja TGOC szczepem *Achromobacter* sp. QXH, zdolnym do rozkładu kwasu 2,4-fenoksyoctowego, zwiększyła wydajność usuwania tego związku ze ścieków w stężeniu 144 i 565 mg/l, odpowiednio o 36% i 62% w porównaniu do osadu kontrolnego. Jednocześnie potwierdzono obecność szczepu w granulach osadu przez 200 dni trwania eksperymentu w liczebności komórek zbliżonej do liczebności wyjściowej (10^5–10^6 komórek/ml osadu).

3.2. Pojedyncze szczepy grzybów mikroskopowych

Mniej powszechne użycie grzybów niż bakterii do biaugmentacji osadu czynnego wynika z ich wolniejszego wzrostu oraz wypierania z tego środowiska w wyniku współzawodnictwa z innymi organizmami [23]. Znane są jednak gatunki grzybów o potencjalnym znaczeniu w bioremediacji środowisk skażonych toksycznymi związkami, co wynika z obecności w ich komórkach lub wydzielanych zewnątrzkomórkowo kompleksów enzymatycznych o niskiej specyficzności substratowej i silnych właściwościach utleniających [24, 25] (Tabela II). Ponadto w ścianie komórkowej grzybów występują grupy funkcyjne (np. karboksylowa, hydroksylowa, aminowa, sulfonowa i fosfonianowa) wiążące toksyczne zanieczyszczenia. Badania Kumar'a i wsp. [33] oraz Kumar'a i Min [34] wskazują na zdol-

Tabela II
Wybrane grzyby mikroskopowe w bioaugmentacji konwencjonalnego osadu czynnego

Grzyby mikroskopowe	Rodzaj ścieków, związek toksyczny (mg/l)	Skala procesu/miejsce	Źródło
Magnusiomyces ingens LH-F1	ścieki syntetyczne, barwnik Acid Red B, 10–100	skala laboratoryjna, Chiny	[26]
Candida tropicalis TL-F1	ścieki syntetyczne, barwnik Acid Red B, 10–50	skala laboratoryjna, Chiny	[35]
Phanerochaete chrysosporium	surowe ścieki koksownicze, fenol, 1800	skala laboratoryjna, Chiny	[24]
Phanerochaete sp. HSD (chlamydospory)	ścieki syntetyczne, fenol, 400–2200	skala laboratoryjna, Chiny	[23]
Trametes versicolor	ścieki syntetyczne, farmaceutyki (ibuprofen, naproksen, ketoprofen, diklofenak, kwas salicylowy, metronidazol), pestycydy (pentachlorofenol, atrazyna), 4-tert-butylofenol, 4-tert-oktylofenol, bisfenol A, 0,005	skala laboratoryjna, Chiny	[51]
Phanerochaete sp. HSD	ścieki syntetyczne, czerń eriochromowa T, 50–400	skala laboratoryjna, Chiny	[22]
Coriolus versicolor	ścieki syntetyczne, atrazyna + aldikarb + alachlor, 10	skala laboratoryjna, Japonia	[20]
Hansenula polymorpha	surowe ścieki z przemysłu chemicznego, formaldehyd, 488 i 1128	skala laboratoryjna, Polska	[31]

ność grzybów *Trametes versicolor* oraz *Schizophyllum commune* do sorpcji fenolu oraz *o*- i *p*-chlorofenolu.

Bioaugmentacja osadu czynnego z udziałem grzybów przeprowadzana jest najczęściej w celu zwiększenia efektywności oczyszczania ścieków zawierających wysokie stężenia leków, związków fenolowych oraz barwników. Potwierdzają to badania Dhouib'a i wsp. [11], którzy wykazali, że inokulacja KOC w skali laboratoryjnej grzybem *T. versicolor*, wydzielającym takie enzymy jak lakaza, peroksydaza manganowa oraz ligninowa, spowodowała wzrost wydajności transformacji hydroksytyrozolu oraz tyrozolu, odpowiednio z 40% do 75% oraz z 31% do 55%. Z kolei Hailei i wsp. [23] wykazali, że bioaugmentacja KOC, wysoko obciążonego ściekami fenolowymi, szczepem *Phanerochaete chrysosporium* przyczyniła się nie tylko do wzrostu szybkości rozkładu fenolu z 840 mg/g lotnych substancji stałych (VSS) na dobę do 1450 mg/g VSS na dobę, ale także do utrzymania stabilności procesu oczyszczania ścieków o stężeniu fenolu 1800 mg/l w porównaniu z osadem nieinokulowanym, zdolnym do rozkładu tego związku w stężeniu nieprzekraczającym 1200 mg/l. Skuteczną bioaugmentację KOC, obciążonego ściekami skażonymi barwnikiem Acid Red B (ARB), szczepem *Candida tropicalis* TL-F1 przeprowadzili także Li i wsp. [35]. Efektem tego zabiegu było skrócenie czasu rozkładu barwnika w stężeniu 25 oraz 50 mg/l, odpowiednio z 3 do 2 oraz z 6 do 3 dni. Jednocześnie zaobserwowano, że wprowadzenie tego grzyba do osadu przyczyniło się do obniżenia toksycznego działania barwnika na mikroorganizmy autochtoniczne.

3.3. Konsorcja mikroorganizmów

Pomimo, że wprowadzanie do środowiska osadu czynnego wyspecjalizowanych, pojedynczych szczepów bakterii i grzybów często przynosi pożądane efekty [46, 75–77], bioaugmentacja z użyciem mieszanych konsorcjów mikroorganizmów wydaje się stanowić bardziej skuteczną strategię w usuwaniu toksycznych zanieczyszczeń ze ścieków (Tabela III). Mieszane konsorcja mikroorganizmów zazwyczaj są zdolne do rozkładu wielu związków jednocześnie, co wynika z uzupełniania się ich zdolności degradacyjnych, a także może być wynikiem mniejszej wrażliwości na zmiany czynników środowiskowych niż pojedynczych szczepów [57]. Quan i wsp. [59] bioaugmentowali w warunkach laboratoryjnych KOC, obciążony 2,4-dichlorofenolem (2,4-DCP) (50 mg/l), konsorcjum bakteryjnym o składzie: *Achromobacter* sp. i *Flavobacterium breve*, zdolnym do rozkładu fenolu i jego pochodnych. Wykazali, że bakterie wprowadzone jednocześnie do reaktora przepływowego z całkowitym wymieszaniem (CSTR) odznaczały się lepszą zdolnością do tworzenia kłaczków i inkorporacji w strukturę osadu czynnego niż inokulowane pojedynczo szczepy. Stwierdzili także, że tempo rozkładu 2,4-DCP zależało od liczebności bakterii w inokulacie. Największą wydajność rozkładu 2,4-DCP (88–99% w ciągu 30 dni) uzyskali, gdy introdukowane konsorcjum bakterii stanowiło 15% objętości reaktora. Dla porównania w osadzie niebioaugmentowanym oraz bioaugmentowanym pojedynczymi szczepami efektywność rozkładu 2,4-DCP wynosiła odpowiednio 46–61% i 78–89%. Niestety wynikiem jednorazowej inokulacji mieszaniny mikroorganizmów do reaktora CSTR było ich stopniowe zamieranie i utrata aktywności degradacyjnej w 100 dniu eksperymentu. W innych badaniach Jiang i wsp. [29] do KOC, zanieczyszczonego syntetycznymi ściekami obciążonymi ładunkiem fenolu (1500 mg/l na dobę), introdukowali 2-składnikowe konsorcjum bakteryjne złożone ze szczepu *Propioniferax* PG-02 zdolnego do rozkładu fenolu oraz szczepu *Comamona*s sp. PG-08 o słabym potencjale degradacji tego związku. Stwierdzili, że wprowadzenie do osadu mieszanej kultury tych mikroorganizmów znacząco poprawiło efektywność usuwania fenolu ze

Tabela III
Konsorcja mikroorganizmów w bioaugmentacji osadu czynnego

Konsorcjum mikroorganizmów	Rodzaj ścieków, związek toksyczny (mg/l)	Skala procesu / miejsce / rodzaj osadu	Źródło
Bacillus thuringiensis B-4-9, *B. cereus* BS-3-12 i *Acidovorax ebreus* JF-3	surowe ścieki rafineryjne: woda (v/v; 1:18; 1:12,5)	skala laboratoryjna, Chiny; KOC	[71]
	surowe ścieki rafineryjne: woda (v/v; 1:18)	pilotażowa oczyszczalnia ścieków, Chiny; KOC	
Bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* i *Micrococcus*	ścieki petrochemiczne	skala techniczna, oczyszczalnia ścieków, Chiny; KOC	[40]
Rhodococcus sp. YYL, *B. cereus* MLY1 i *B. aquimaris* MLY2	ścieki syntetyczne, tetrahydrofuran, 1442	skala laboratoryjna, Chiny, KOC	[78]
Konsorcjum BM-S-1	ścieki garbarskie	pilotażowa oczyszczalnia ścieków, Korea; KOC	[32]
Pandoraea sp. PG-01 i *Rhodococcus erythropolis* PG-03	ścieki syntetyczne, fenol, 500	skala laboratoryjna, Chiny; KOC	[29]
Propioniferax PG-02 i *Comamona*s sp. PG-08	ścieki syntetyczne, fenol, 500	skala laboratoryjna, Chiny; TGOC	[30]
Konsorcjum nieoznaczonych szczepów, *Achromobacter* sp. i *Flavobacterium breve*	ścieki syntetyczne, 2,4-dichlorofenol, 50	skala laboratoryjna, Chiny; KOC	[59]
Coriolus versicolor, *Phanerochaete chrysosporium* i *Azotobacter* sp.	surowe ścieki z przemysłu papierniczego z dodatkiem ługu czarnego	skala laboratoryjna, Chiny, KOC	[81]
Konsorcjum *Cryptococcus humicolus* MCN2 i bakterii rozkładających cyjanki	ścieki syntetyczne, cyjanek potasu, 25–50	skala laboratoryjna, Korea; KOC	[55]
Pandoraea B-6, *Comamonas* B-9 i *Aspergillus* F-1	mieszanina syntetycznych i surowych ścieków z przemysłu papierniczego z dodatkiem ługu czarnego	skala laboratoryjna, Chiny; KOC	[21]

Objaśnienia: KOC – konwencjonalny osad czynny, TGOC – tlenowy granulowany osad czynny

ścieków w stosunku do eliminacji tego związku w osadzie bioaugmentowanym pojedynczymi szczepami. Ponadto wykazali kooperację pomiędzy badanymi drobnoustrojami, dzięki występującej między nimi silnej koagregacji (67–74%) oraz zdolności do komunikacji za pośrednictwem autoinduktorów. Całkowitą mineralizację fenolu w osadzie czynnym obserwowali po 2 dniach od momentu wprowadzenia konsorcjum bakteryjnego, podczas gdy inokulowanie do tego środowiska szczepu *Comamona*s sp. PG-08 indywidualnie wydłużało czas degradacji tego związku do 16 dni. Dla porównania osad bioaugmentowany z użyciem szczepu *Propioniferax* PG-02 oraz osad niebioaugmentowany nie były zdolne do rozkładu fenolu, co skutkowało upośledzeniem procesu tworzenia kłaczków. Bioaugmentacja osadu konsorcjum bakteryjnym wspomagała natomiast proces tworzenia kłaczków już po 7 dniach od momentu inokulacji. Podobnie Yao i wsp. [78] stwierdzili istnienie kooperacji pomiędzy zdolnym do mineralizacji tetrahydrofuranu (THF) szczepem *Rhodococcus* sp. YYL, a nierozkładającymi tego związku szczepami *B. cereus* MLY1 i *Bacillus aquimaris* MLY2, użytymi do bioaugmentacji KOC obciążonego ściekami syntetycznymi zawierającymi THF (1442 mg/l). Wykazali, że bioaugmentacja osadu z użyciem mieszanej kultury mikroorganizmów okazała się bardziej efektywnym rozwiązaniem w usuwaniu THF ze ścieków niż inokulacja pojedynczym szczepem *Rhodococcus* sp. YYL, który nie był w stanie kolonizować tego środowiska. Natomiast szczepy z rodzaju *Bacillus*, obdarzone cechami umożliwiającymi im przeżywanie w osadzie czynnym, wspomogły inkorporację bakterii *Rhodococcus* sp. YYL w strukturę kłaczków, co przyczyniło się do uzyskania praktycznie całkowitego rozkładu THF w ściekach w ciągu 20 dni. W innych badaniach Chattaraj i wsp. [7] wykorzystali mieszane konsorcjum bakteryjne VN11, obejmujące szczepy: *Providencia* sp. VN11A, *Brevibacillus* sp. VN11B, *Alcaligenes* sp. VN11C i *Pseudomonas* sp. VN11D do bioaugmentacji KOC, obciążonego typowymi ściekami doprowadzanymi do oczyszczalni ścieków. Wykazali, że wprowadzenie do osadu badanych mikroorganizmów umożliwiło skuteczne usuwanie różnego rodzaju zanieczyszczeń w warunkach tlenowych oraz w warunkach anoksji, w temperaturze 37°C oraz pH 7,0. Inokulacja osadu czynnego konsorcjum bakteryjnym przyczyniła się do eliminacji substancji stałych, związków fosforu, azotu i siarki oraz fenoli na poziomie, odpowiednio 82, 80, 86, 81 i 89%.

Dane literaturowe wskazują, że nie zawsze zastosowanie do bioaugmentacji osadu czynnego podobnych do siebie pod względem funkcjonalnym grup mikroorganizmów odnosi oczekiwany skutek. Park i wsp. [55]

nie obserwowali pozytywnego wpływu bioaugmentacji KOC mieszanym konsorcjum drożdży *Cryptococcus humicolus* MCN2 oraz niezidentyfikowanych mikroorganizmów na rozkład cyjanku potasu (KCN) (25–50 mg/l) w ściekach syntetycznych. Stwierdzili natomiast znaczne pogorszenie właściwości osadu czynnego w wyniku jego narażenia na toksyczne działanie KCN. Z kolei Jiang i wsp. [30] wykazali, że jednoczesne wprowadzenie do KOC, skażonego syntetycznymi ściekami obciążonymi ładunkiem fenolu (1500 mg/l na dobę), szczepów *Pandoraea* sp. PG-01 i *Rhodococcus erythropolis* PG-03 prowadziło do kompetycji między tym mikroorganizmami. Wynikiem tego zjawiska była dominacja bakterii Gram-ujemnej, odznaczającej się szybszym wzrostem w obecności hydroksybenzenu niż bakterii Gram-dodatniej. Stwierdzili ponadto, że inokulowane pojedynczo do osadu szczepy były zdolne do przeżywania w tym środowisku, pomimo braku zdolności do agregacji, tworzenia biofilmu oraz produkcji bioflokulantów.

3.4. Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie

Wprowadzenie do osadu czynnego mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie, będących donorami genów katabolicznych zlokalizowanych w plazmidach lub innych ruchomych elementach genetycznych, takich jak transpozony czy wyspy genomowe, stanowi alternatywę dla klasycznej bioaugmentacji (Tabela IV). Strategia ta nie jest jednak powszechnie stosowana w systemach biologicznego oczyszczania ścieków ze względu na obawy związane z horyzontalnym transferem genów [68]. Ponadto zmodyfikowane szczepy bakterii o wysokiej aktywności degradacyjnej po introdukcji do osadu czynnego często trudno adaptują się do warunków panujących w tym środowisku, tracą zdolności rozkładu lub transformacji toksycznych zanieczyszczeń i w konsekwencji zamierają.

Jin i wsp. [28] w swoich badaniach oceniali wpływ inokulacji KOC genetycznie modyfikowanym szczepem *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR), będącym gospodarzem plazmidu zawierającego gen kodujący enzym azoreduktazę, na wydajność dekoloryzacji barwnika C.I. Direct Blue 71 (DB71) przy różnych wartościach pH. Największą wydajność dekoloryzacji DB71 w stężeniu 150 mg/l (89%) autorzy uzyskali w ciągu 12 godzin w osadzie bioaugmentowanym o pH 9, natomiast w bioaugmentowanym osadzie o pH 5 wydajność dekoloryzacji wyniosła w tym samym czasie 67%. Ponieważ w osadzie nieinokulowanym o pH 5 redukcja barwnika kształtowała się na zbliżonym poziomie (70%) jak w osadzie inokulowanym o pH 9, stwierdzono, że bioaugmentacja osadu szczepem *E. coli* JM109 (pGEX-AZR) była szczególnie efektywna przy oczyszczaniu ścieków obciążonych DB71 o silnie zasadowym pH. W innych badanich Quan i wsp. [61] inokulowali TGOC szczepem *P. putida* SM1443, gospodarzem plazmidu pJP4, zawierającym między innymi geny kodujące enzymy dioksygenazę kwasu 2,4-D-dichlorofenoksyoctowego / α-oksoglutarowego i monooksygenazę 2,4-dichlorofenolową, zaangażowane w procesy transformacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D). Wykazali, że w osadzie bioaugmentowanym 2,4-D (160 mg/l) uległ całkowitej degradacji w ciągu 62 godzin, natomiast w osadzie niebioaugmentowanym w tym czasie biodegradacji uległo około 26% wyjściowej dawki tego związku.

Ważną zaletą ruchomych elementów genetycznych u bakterii jest zdolność przenoszenia informacji genetycznej o syntezie enzymów katabolicznych między

Tabela IV
Genetycznie modyfikowane mikroorganizmy w bioaugmentacji osadu czynnego w skali laboratoryjnej

Mikroorganizm	Wektory/geny kataboliczne	Związek, mg/l / Rodzaj osadu	Źródło
Rhodococcus sp. p52	plazmidy pDF01 i pDF02 (geny kodujące dioksygenazę)	dibenzofuran, 300; KOC	[71]
Pseudomonas putida SM1443	plazmid pJP4 (geny kodujące m.in. dioksygenazę kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego/α-oksoglutarowego i monooksygenazę 2,4-dichlorofenolową	kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, 400; 4-chlorofenol, 5–45; 2,4-dichlorofenol, 25–45; 2,4,6-trichlorofenol, 5–20; TGOC	[41, 61]
Pseudomonas putida SM1443		kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, 8–385; TGOC	[61]
Escherichia coli JM109 (pGEX-AZR)	wektor pGEX4T-1 (gen kodujący azoreduktazę)	Direct Blue 71,150–550; KOC	[28]
Comamonas testosteroni SB3	plazmid pNB2::dsRed (gen kodujący dioksygenazę)	3-chloroanilina, 8–100; KOC	[4]
Pseudomonas putida KT2442	plazmid pWWO (geny kodujące oksygenazę toluenową oraz enzymy szlaku meta)	alkohol benzylowy, 540; TGOC	[49]

Objaśnienia: KOC – konwencjonalny osad czynny, TGOC – tlenowy granulowany osad czynny

komórkami nawet odległych filogenetycznie gatunków bakterii. Bathe i wsp. [4] oceniali efekt bioaugmentacji KOC, skażonego ściekami zawierającymi 3-chloroanilinę (3-CA) w zakresie stężeń 100–400 mg/l, szczepem *C. testosteroni* SB3, gospodarzem plazmidu pNB2::dsRed, niosącego geny kodujące enzymy zaangażowane w rozkład 3-CA. Stwierdzili, że szczep ten słabo przeżywał w osadzie i w 62 dniu eksperymentu stanowił zaledwie 1% całkowitej populacji mikroorganizmów. Jednocześnie potwierdzili wzrost liczby kopii plazmidu pNB2::dsRed w środowisku osadu, co wskazywało na transfer oraz ekspresję genów odpowiedzialnych za rozkład tego związku w komórkach mikroorganizmów autochtonicznych, mimo słabej przeżywalności dawcy. Nie mniej jednak wprowadzenie badanego szczepu do KOC korespondowało z całkowitym rozkładem 3-CA w ciągu 40 dni.

W innych badaniach Sun i wsp. [71] oceniali efektywność transferu genów katabolicznych zlokalizowanych w plazmidach pDF01 i pDF02 z komórek *Rhodococcus* sp. p52 inokulowanych do KOC do mikroorganizmów autochtonicznych na rozkład dibenzofuranu (DBF) (300 mg/l). Stwierdzili, że w bioaugmentowanym osadzie całkowity rozkład DBF nastąpił w czasie 60 dni, podczas gdy w osadzie nieinokulowanym biodegradacja tego związku nie zachodziła.

3.5. Biopreparaty handlowe

Stosowane na potrzeby bioaugmentacji komercyjne biopreparaty, zawierające zdefiniowane konsorcja mikroorganizmów, wykazują wiele zalet z uwagi na ich aspekty praktyczne. Stosowanie ich eliminuje przede wszystkim konieczność izolowania oraz odpowiedniego przygotowywania drobnoustrojów. Ponadto są one łatwe w magazynowaniu i dozowaniu. Biopreparaty dostępne są najczęściej w postaci roztworów oraz liofilizatów, co zapewnia utrzymanie stałego stężenia mikroorganizmów dostarczanych do reaktora biologicznego. Poza wyselekcjonowanymi mikroorganizmami w ich skład mogą wchodzić także enzymy, mikro- i makroelementy, surfaktanty, związki regulujące pH i stymulujące wzrost bakterii oraz składniki wiążące odory. Pewną niedogodnością z naukowego punktu widzenia w stosowaniu tych produktów jest brak znajomości ich szczegółowego składu mikrobiologicznego i chemicznego z uwagi na ochronę patentową. Ponadto z wielu prac wynika, że mikroorganizmy w takich preparatach mogą utracić swoją aktywność lub zdolności do wzrostu na skutek liofilizacji lub nieodpowiedniego przechowywania [2]. Z badań Miyamoto-Shinohara i wsp. [43] wynika na przykład, że proces liofilizacji oraz przechowywanie liofilizatów w niskich temperaturach i w warunkach próżni miały istotny wpływ na przeżywalność różnych grup mikroorganizmów. Najbardziej wrażliwe na działanie tej procedury były drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, których przeżywalność po liofilizacji spadła do 10% i utrzymywała się na tym poziomie w ciągu 10 lat przechowywania w warunkach próżni. Dla odmiany śmiertelność bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich po liofilizacji wynosiła, odpowiednio 50 i 80% i wyraźnie się zmniejszała w wyniku dalszego przechowywania (do 5% w ciągu 5 lat).

Obecnie spośród wielu dostępnych na rynku biopreparatów tylko niektóre znajdują zastosowanie do wspomagania rozkładu toksycznych zanieczyszczeń obecnych w ściekach. Należą do nich między innymi preparaty Phenol-Bac i In-balance firmy Lucerne biotech, stosowane do usuwania ze ścieków fenolu i jego pochodnych, benzenu i alkoholi. Natomiast przeważająca większość preparatów używana jest do poprawy struktury kłaczków i właściwości flokulacyjnych osadu czynnego, intensyfikacji procesu nitryfikacji, redukcji pienienia, odorów i osadu nadmiernego.

4. Podsumowanie

Z dokonanego przeglądu literatury wynika, że bioaugmentacja KOC i TGOC jest obiecującą metodą w zwiększaniu wydajności usuwania szkodliwych zanieczyszczeń ze ścieków. O jej skuteczności decyduje przede wszystkim dobór mikroorganizmów do inokulacji o pożądanych zdolnościach degradacji konkretnych związków, wbudowywania się w strukturę kłaczków i granul oraz synergicznym typie oddziaływań z mikroflorą autochtoniczną. Efekt bioaugmentacji mogą także wspomagać dodatkowe zabiegi poprzedzające inokulację, jak adaptacja wybranych szczepów do rozkładu toksycznych związków, głodzenie, biostymulacja czyli dostarczenie mikroorganizmom dodatkowych źródeł węgla, azotu i fosforu, biosurfaktantów, substancji mineralnych oraz immobilizacja komórek na różnych nośnikach. Duże nadzieje wiąże się także z zastosowaniem nowoczesnych technik molekularnych do monitorowania liczebności i aktywności inokulantów w osadzie. Ze względu na to, że większość prowadzonych badań nad bioaugmentacją osadu ogranicza się do skali laboratoryjnej i wiedza w zakresie interakcji między introdukowanymi szczepami a zespołami mikroorganizmów autochtonicznych jest wciąż ograniczona, konieczne jest przeprowadzanie testów w skali technicznej, odzwierciedlającej rzeczywiste warunki eliminacji zanieczyszczeń oraz poszukiwanie skutecznych narzędzi do monitorowania losów inokulantów w tym ekosystemie.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu nr 2016/23/N/NZ9/00158 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Piśmiennictwo

1. Almaguer-Cantú V., Morales-Ramos L.H., Balderas-Rentería I.: Biosorption of lead (II) and cadmium (II) using *Escherichia coli* genetically engineered with mice metallothionein I. *Water Sci. Technol*. **63**, 1607–1613 (2011)
2. Augustynowicz J., Kaszycki P., Kuś M., Białecka A., Kołoczek H.: Optimized methods for stabilization of microbial communities specializing in biodegradation of organic environmental contaminants. *Pol. J. Environ. Stud*. **17**, 655–664 (2008)
3. Barr J.J., Slater F.R., Fukushima T., Bond P.L.: Evidence for bacteriophage activity causing community and performance changes in a phosphorus-removal activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol*. **74**, 631–642 (2010)
4. Bathe S., Schwarzenbeck N., Hausner M.: Bioaugmentation of activated sludge towards 3-chloroaniline removal with a mixed bacterial population carrying a degradative plasmid. *Bioresour. Technol*. **100**, 2902–2909 (2009)
5. Cai B., Xie L., Yang D., Arcangeli J.P.: Toxicity evaluation and prediction of toxic chemicals on activated sludge system. *J. Hazard. Mater*. **177**, 414–419 (2010)
6. Chasib K.F.: Extraction of phenolic pollutants (phenol and *p*-chlorophenol) from industrial wastewater. *J. Chem. Eng. Data*, **58**, 1549–1564 (2013)
7. Chataraj S., Purohit H.J., Sharma A., Jadeja N.B., Madamwar D.: Treatment of common effluent treatment plant wastewater in a sequential anoxic-oxic batch reactor by developed bacterial consortium VN11. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **179**, 514–529 (2016)
8. Chen J., Zhan P., Koopman B., Fang G., Shi Y.: Bioaugmentation with *Gordonia* strain JW8 in treatment of pulp and paper wastewater. *Clean Technol. Envir*. **14**, 899–904 (2012)
9. Chen G., Zhu N., Tang Z., Ye P., Hu Z., Liu L.: Resource availability shapes microbial motility and mediates early-stage formation of microbial clusters in biological wastewater treatment processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **98**, 1459–1467 (2014)
10. Cirja M., Hommes G., Ivashechkin P., Prell J., Schäffer A., Corvini F. X., Lenz M.: Impact of bio-augmentation with *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 in membrane bioreactors degrading nonylphenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **84**, 193–189 (2009)
11. Dhouib A., Ellouz M., Aloui F., Sayadi S.: Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Lett. Appl. Microbiol*. **42**, 405–411 (2006)
12. Duque A.F, Bessa V.S, Castro M.L: Characterization of the bacterial communities of aerobic granules in a 2-fluorophenol degrading process. *Biotechnol. Rep.* **5**, 98–104 (2015)
13. Fatone F., Di Fabio S., Bolzonella D., Cecchi F.: Fate of aromatic hydrocarbons in Italian municipal wastewater systems: an overview of wastewater treatment using conventional activated-sludge processes (CASP) and membrane bioreactors (MBRs). *Water Res.* **45**, 93–104 (2011)
14. Fu W., Fu H., Skøtt K., Yang M.: Modeling the spill in the Songhua River after the explosion in the petrochemical plant in Jilin. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. **15**, 178–181 (2008)
15. Gromiec M.J.: NEREDA – innowacyjna technologia granulowanego osadu czynnego do oczyszczania ścieków przemysłowych i komunalnych. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna,* **5**, 179–183 (2011)
16. Guo J., Wang J. Cui D., Wang L., Ma F., Chang C-C., Yang J.: Application of bioaugmentation in the rapid start-up and stable operation of biological processes for municipal wastewater treatment at low temperatures. *Bioresour. Technol*. **110**, 6622–6629 (2010)
17. Guo J., Penga Y., Huang H., Wang S., Ge S., Zhang J., Wang Z.: Short- and long-term effects of temperature on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *J. Hazard. Mater*. **179**, 471–479 (2010)
18. Guo J.Y., Yu J.: Sorption characteristics and mechanisms of Pb(II) from aqueous solution by using bioflocculant MBFR10543. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **98**, 6431–6441 (2014)
19. Gupta A., Thakur I.S.: Study of optimization of wastewater contaminant removal along with extracellular polymeric substances (EPS) production by a thermotolerant *Bacillus* sp. ISTVK1 isolated from heat shocked sewage sludge. *Bioresour. Technol*. **213**, 21–30 (2016)
20. Hai F., Modin O., Yamamoto K., Nghiem L.D.: Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white rot fungi. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng*. **43**, 459–462 (2012)
21. Hailei W., Ping L., Feng P.: The effect of bioaugmentation on the performance of sequencing batch reactor and sludge characteristics in the treatment process of papermaking wastewater. *Bioproc. Biosyst. Eng*. **29**, 283–289 (2006)
22. Hailei W., Ping L., Guosheng L., Xin L., Jianming Y.: Rapid biodecolourization of eriochrome black T wastewater by bioaugmented aerobic granules cultivated through a specific method. *Enzyme Microb. Tech*. **47**, 37–43 (2010)
23. Hailei W., Li L., Ping L., Hui L., Guoshenga L., Jianming Y.: The acceleration of sludge granulation using the chlamydospores of *Phanerochaete* sp. HSD. *J. Hazard. Mater*. **192**, 963–969 (2011)
24. Hailei W., Ping L., Ling W., Lei L., Jianming Y.: Metagenomic insight into the bioaugmentation mechanism of *Phanerochaete chrysosporium* in an activated sludge system treating coking wastewater. *J. Hazard. Mater*. **321**, 820–829 (2017)
25. Harms H., Schlosser D., Wick L. W.: Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol*. **9**, 177–192 (2011)
26. He M., Tan L., Ning S., Song L., Shi S.: Performance of the biological aerated filter bioaugmented by a yeast *Magnuaiomyces ingens* LH-F1 for treatment of Acid Red B and microbial community dynamics. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **33**, 39 (2017)
27. Ikeda-Ohtsubo W., Miyahara M., Kim S-W., Yamada T., Matsuoka M., Watanabe A., Fushinobu S., Wakagi T., Shoun H., Miyauchi K., Endo G.: Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2. *J. Biosci. Bioeng*. **15**, 37–42 (2013)
28. Jin R., Yang H., Zhang A., Wang J., Liu G.: Bioaugmentation on decolorization of C.I. Direct Blue 71 by using genetically engineered strain *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR). *J. Hazard. Mater*. **163**, 1123–1128 (2009)
29. Jiang H-L., Tay J-H., Maszenian A.M., Tay S.T-L.: Enhanced phenol biodegradation and aerobic granulation by two coaggregating bacterial strains. *Environ. Sci. Technol*. **40**, 6137–6142 (2006)
30. Jiang H-L., Maszenan A. M., Tay J-H.: Bioaugmentation and coexistence of two functionally similar bacterial strains in aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **75**, 1191–1200 (2007)
31. Kaszycki P., Kołoczek H.: Biodegradation of formaldehyde and its derivatives in industrial wastewater with methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and with the yeast-bioaugmented activated sludge. *Biodegradation*, **13**, 91–99 (2002)
32. Kim I-S., Ekpeghere K., Ha S-Y., Kim S-H., Kim B-S., Song B., Chun J., Chang J-S., Kim H-G., Koh S-C.: An eco-friendly treatment of tannery wastewater using bioaugmentation with a novel microbial consortium. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng*. **48**, 1732–1739 (2013)
33. Kumar N.S., Boddu V.M., Krishnaiah A.: Biosorption of phenolic compounds by *Trametes versicolor polyporus* fungus. *Adsorp. Sci. Technol*. **21**, 31–46 (2009)
34. Kumar N.S., Min K.: Phenolic compounds biosorption onto *Schizophyllum commune* fungus: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling. *Chem. Eng. J*. **168**, 562–571 (2011)

35. Li H., Tan L., Ning S., He M.: Reactor performance and microbial community dynamics during aerobic degradation and detoxification of Acid Red B with activated sludge bioaugmented by a yeast *Candida tropicalis* TL-F1 in MBR. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. **104**, 149–156 (2015)
36. Liu X.W., Sheng G.P., Yu H.Q.: Physicochemical characteristics of microbial granules. *Biotechnol. Adv.* **27**, 1061–1070 (2009)
37. Liu X., Chen Y., Zhang X., Wang L.: Aerobic granulation strategy for bioaugmentation of a sequencing batch reactor (SBR) treating high strength pyridine wastewater. *J. Hazard. Mater*. **15**, 153–160 (2015)
38. Liu J., Yu Y., Chang Y., Li B., Bian D., Yang W., Huo H., Huo M., Zhu S.: Enhancing quinoline and phenol removal by adding *Comamonas testosteroni* bdq06 in treatment of an accidental dye wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. **115**, 74–82 (2016)
39. Lourenço N.D., Franca R.D.G.,. Moreira M.A., Gil F.N., Viegas C.A., Pinheiro H.M.: Comparing aerobic granular sludge and flocculent sequencing batch reactor technologies for textile wastewater treatment. *Biochem. Eng. J*. **104**, 57–63 (2015)
40. Ma F., Guo J-B., Zhao L-J., Cahng C-C., Cui D.: Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresour. Technol*. **100**, 597–602 (2009)
41. Ma J-Y., Quan X-C., Yang Z-F., Li A-J.: Biodegradation of a mixture of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and multiple chlorophenols by aerobic granules cultivated through plasmid pJP4 mediated bioaugmentation. *Chem. Eng. J*. **181–182**, 144–151 (2012)
42. Martín-Hernández M., Suárez-Ojeda M.E., Carrera J.: Bioaugmentation for treating transient or continuous *p*-nitrophenol shock loads in an aerobic sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol*. **123**, 150–156 (2012)
43. Miyamoto-Shinohara Y., Imaizumi T., Sukenobe J., Murakami Y., Kawamura S., Komatsu Y.: Survival rate of microbes after freeze--drying and long-term storage. *Cryobiology*, **3**, 251–255 (2000)
44. Miège C., Choubert J.M., Ribeiro L., Eusèbe M., Coquery M.: Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants-conception of a database and first results. *Environ. Pollut*. **157**, 1721–1726 (2008)
45. Morling S., Åstrand N., Lindar A.N.: Biological removal of nitrogen compounds at a coke-oven effluent stream. *J. Water Res. Prot*. **4**, 400–406 (2012)
46. Monsalvo V.M., Tobajas M., Mohedano A. F., Rodriguez J.J.: Intensification of sequencing batch reactors by cometabolism and bioaugmentation with *Pseudomonas putida* for the biodegradation of 4-chlorophenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87**, 1270–1275 (2012)
47. More T.T., Yadav J.S.S., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y.: Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J. Environ. Manage.* **144**, 1–25 (2014)
48. Mrozik A., Piotrowska-Seget Z.: Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res*. **165**, 363–375 (2010)
49. Nancharaiah Y.V., Joshi H.M, Hausner M., Venugopalan V.P.: Bioaugmentation of aerobic microbial granules with *Pseudomonas putida* carrying TOL plasmid. *Chemosphere*, **71**, 30–35 (2008)
50. Nancharaiah Y.V., Reddy G.K.K. Aerobic granular sludge technology: mechanisms of granulation and biotechnological applications. *Bioresour. Technol*. DOI:10.1016/j.biortech.2017.09.13 (2017)
51. Nguyen L.N., Hai F.I., Yang S., Kang J., Leuch F.D.L., Roddick F., Price W.E., Nghiem L.D.: Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Bioresour. Technol*. **148**, 234–241 (2013)
52. Nouha K.: EPS producing microorganisms from municipal wastewater activated sludge. *J. Pet. Environ. Biotechnol*. **7**, 1–13 (2015)
53. Nwanyanwu C., Alisi C.S., Newke C.O., Chibuogwu O.: Cell surface properties of phenol-utilizing bacteria isolated from petroleum refinery wastewater. *J. Res. Biol*. **2**, 383–391 (2012)
54. Nzila A., Razzak S.A., Zhu J.: Bioaugmentation: an emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **13**, 1–20 (2016)
55. Park D., Lee D.S., Kim Y.M., Park J.M.: Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresour. Technol.* **99**, 2092–2096 (2008)
56. Podedworna J., Piechna P.: Tlenowy granulowany osad czynny. Koncepcje mechanizmów formowania, właściwości i wymagania technologiczne. Seidel-Przywecki Sp z o.o., Józefosław, 2017.
57. Qu Y., Zhang X., Ma Q., Deng J., Deng Y., Van Nostrand J. D., Wu L., He Z., Qin Y., Zhou J., Zhou J.: Microbial community dynamics and activity link to indigo production from indole in bioaugmented activated sludge systems. *PLoS One*, **10**, 1–15 (2015)
58. Qu Y., Zhang R., Ma Q., Zhou J., Yn B.: Bioaugmentation with a novel alkali-tolerant *Pseudomonas* strain for alkaline phenol wastewater treatment in sequencing batch reactor. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **27**, 1919–1926 (2011)
59. Quan X., Schi H., Liu H., Lv P., Qian Y.: Enhancement of 2,4-dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture. *Water Res*. **28**, 245–253 (2004)
60. Quan X., Ma J., Xiong W., Wang X.: Bioaugmentation of half--matured granular sludge with special microbial culture promoted establishment of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid degrading aerobic granules. *Bioprocess Biosyst. Eng*. **38**, 1081–1090 (2015)
61. Quan X-C., Tang H., Xiong W-C., Yang Z-F.: Bioaugmentation of aerobic sludge granules with a plasmid donor strain for enhanced degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Hazard. Mater*. **179**, 1136–1142 (2010)
62. Sarma S.J., Tay J.H.: Aerobic granulation for future wastewater treatment technology: challenges ahead. *Environ. Sci. Water Res. Technol*. DOI:10.1039/c7ew00148g (2017)
63. Saunders A.M., Albertsen M., Vollertsen J., Nielsen P.H.: The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *ISME J*. **10**, 11–20 (2016)
64. Schneider I., Topalova Y.: Microbial structure and functions of biofilm during wastewater treatment in the dairy industry. *Biotechnol. Biotec. Eq*. **27**, 3782–3786 (2013)
65. Sheng G., Yu H., Li X.: Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv*. **28** 882–894 (2010)
66. Singhal N., Perez-Garcia O.: Degrading organic micropollutants: the next challenge in the evolution of biological wastewater treatment processes. *Front. Environ. Sci*. **4**, 1–5 (2016)
67. Sipma J., Osuna M.B., Emanuelsson M.A.E., Castro P.M.: Biotreatment of industrial wastewaters under transient-state conditions: process stability with fluctuations of organic load, substrates, toxicants, and environmental parameters. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol*. **40**, 147–197 (2010)
68. Soda S., Otsuki H., Inoue., Tsutsui H., Sei K., Ike M.: Transfer of antibiotic multiresistant plasmid RP4 from *Escherichia coli* to activated sludge bacteria. *J. Biosci. Bioeng*. **3**, 292–296 (2008)
69. Song Z., Ning T., Chen Y., Cheng X., Ren N.: Bioaugmentation of aerobic granular sludge with the addition of a bioflocculant-producing consortium. *Adv. Mat. Res*. **726–731**, 2530–2535 (2013)

70. Sun S., Fang L., Song Z., Wang X., Wang J., Luo Y., Zhang Z., Zhang G., Jiang Q., Zhang Z.: Bioaugmentation for improving the activated sludge process of treating refinery spent caustic: laboratory and field pilot-scale studies. *Desalin. Water Treat.* **57**, 1–8 (2016)
71. Sun Y.Q., Ding P., Peng P., Yang H., Li L.: Conjugative transfer of dioxin-catabolic megaplasmids and bioaugmentation prospects of a *Rhodococcus* sp. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 6298–6307 (2017)
72. Wang M.Z., Yang G.Q., Min H., Lv Z.M., Jia X.Y.: Bioaugmentation with the nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HF-1 in a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: degradation study and analysis of its mechanisms. *Water Res.* **43**, 4187–4196 (2009)
73. Wang J., He H., Wang M., Wang S., Zhang J., Wei W., Xu H., Lv Z., Shen D.: Bioaugmentation of activated sludge with *Acinetobacter* sp. TW enhances nicotine degradation in a synthetic tobacco wastewater treatment system. *Bioresour. Technol.* **142**, 445–453 (2013)
74. Wen Q.X., Zhang H.C., Chen Z.Q., Zhao Y., Feng Y.J.: Bioaugmentation for polyacrylamide degradation in a sequencing batch reactor and contact oxidation reactor. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **47**, 358–365 (2012)
75. Wen D., Zhang J., Xiong R., Liu R., Chen L.: Bioaugmentation with a pyridine-degrading bacterium in a membrane bioreactor treating pharmaceutical wastewater. *J. Environ. Sci.* **25**, 2265–2271 (2013)
76. Xenofontos E., Tanase A-M., Stoica I., Vyrides I.: Newly isolated alkalophilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high *p*-cresol removal. *New Biotechnol.* **33**, 305–310 (2016)
77. Xu P., Ma W., Han H., Jia S., Hou B.: Isolation of a naphthalene--degrading strain from activated sludge and bioaugmentation with it in a MBR treating coal gasification wastewater. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **94**, 358–364 (2015)
78. Yao Y.L., Lv Z.M., Zhu F.X., Min H., Bian C.M.: Successful bioaugmentation of an activated sludge reactor with *Rhodococcus* sp. YYL for efficient tetrahydrofuran degradation. *J. Hazard. Mater.* **261**, 550– 558 (2013)
79. Yu F-B., Ali S.W., Guan L-B., Li S-P., Zhou S.: Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *J. Hazard. Mater.* **176**, 20–26 (2010)
80. Zhang W., Li C.: Exploiting quorum sensing interfering strategies in gram-negative bacteria for the enhancement of environmental applications. *Front. Microbiol.* **6**, 1–15 (2016)
81. Zheng Y., Chai L-Y., Yang Z-H., Tang C-J., Chen Y-H., Shi Y.: Enhanced remediation of black liquor by activated sludge bioaugmented with a novel exogenous microorganism culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 6525–6535 (2013)
82. Zhou J., Xu Y., Qu Y., Tan L.: Decolorization of Brilliant Scarlet GR enhanced by bioaugmentation and redox mediators under high-salt conditions. *Bioresour. Technol.* **101**, 586–591 (2010)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 138–144
http://www.pm.microbiology.pl

ORTOMYKSOWIRUSY – WIRUSY GRYPY I INNE

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 we wrześniu 2017 r., zaakceptowano w marcu 2018 r.

Streszczenie: Ortomyksowirusy to rodzina wirusów, której najbardziej znanymi przedstawicielami są wirusy grypy (typu A, B, C, D), stanowiące istotny problem kliniczny. Grypa, choroba dotycząca zwierząt oraz ludzi rozprzestrzenia się droga kropelkową. Manifestuje się objawami takimi jak kaszel, kichanie, ból mięśni czy gorączka. Często daje też powikłania, do których zalicza się m in zapalenie płuc i zapalenie mięśnia sercowego. W przeszłości wirusy grypy były odpowiedzialne za powstanie pandemii, spośród których najbardziej znaną jest pandemia hiszpanki. Miała miejsce w latach 1918–1919 i uważa się, że spowodowała zgon nawet do 100 mln osób. Zaliczyć do tej rodziny możemy także rodzaj *Isavirus*, odpowiedzialny za anemię ryb, *Quaranjavirus* oraz *Thogotovirus*, wśród których są także gatunki chorobotwórcze dla człowieka. Występują one zdecydowanie rzadziej niż wirusy grypy i są również mniej poznane. Cały czas odkrywa się nowe gatunki. Przykładowo zakażenie u człowieka wirusem Bourbon zostało stwierdzone tylko jeden raz, w 2014 roku.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka. 3. Replikacja na przykładzie wirusa grypy typu A. 4. Historia. 5. Metody diagnostyczne. 6. Chorobotwórczość. 6.1. Grypa – wirusy Influenza. 6.2. *Thogotovirus* 6.3. *Isavirus.* 6.4. *Quaranjavirus*. 7. Leczenie. 8. Podsumowanie

Orthomyxoviruses – Influenza and other viruses

Abstract: The Orthomyxoviruses is a family of viruses with its most common representatives being the influenza viruses (A, B, C and D types), which constitute a significant clinical problem. Influenza is a disease affecting animals and people. It is transmitted by airborne droplets and manifestes itself with such symptoms as coughing, sneezing, muscle pain or fever. Influenza often leads to complications, including pneumonia and myocarditis. In the past, influenza viruses were responsible for pandemics, including the most infamous pandemic of the Spanish influenza. It took place in the years 1918–1919 and is thought to have been responsible for the death toll of as many as 100 million people. The family also includes *Isavirus*, responsible for fish anaemia, *Quaranjavirus* and *Thogotovirus*, among which there also species causing diseases in humans. For example, a human infection with the Bourbon virus was diagnosed only once, in 2014. These viruses are much more rare then influenza viruse and also less known. New species are still discovered.

1. Introduction. 2. Characteristics. 3. Replication of a model *Influenzavirus A*. 4. History. 5. Diagnostic methods. 6. Pathogenicity. 6.1. Influenza – Influenza viruses. 6.2. *Thogotovirus.* 6.3. *Isavirus.* 6.4. *Quaranjavirus*. 7. Treatment. 8. Summary

Słowa kluczowe: Ortomyksowirusy, wirus grypy, *Thogotovirus*, *Isavirus*, *Quaranjavirus*
Key words: Orthomyxoviruses, Influenza virus, *Thogotovirus*, *Isavirus*, *Quaranjavirus*

1. Wstęp

Ortomyksowirusy to rodzina wirusów, do której należą następujące rodzaje: *Influenzavirus A, Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Influenzavirus D* [21]. Do tej rodziny należą także następujące rodzaje: *Thogotovirus*, *Quaranjavirus* oraz *Isavirus*. Na grypę rocznie choruje 5–25% populacji a umiera 0,5–1 mln ludzi [5]. Choroba ta jest przenoszona drogą kropelkową, zajmuje układ oddechowy i charakteryzuje się obecnością m.in. gorączki, kaszlu oraz kataru. Oprócz tego rodzina ta wywołuje wiele innych chorób ludzi (np. choroby wywołane przez wirusy *Dhori* lub *Quaranfil*), a także zwierząt, jak np. anemia łososiowa wywołana przez wirus ISA.

2. Charakterystyka

Ortomyksowirusy mają średnicę 80–120 nm, choć zdarzają się również mniejsze – wirus *Bakten* – o wielkości 50–100 nm [13]. Ich kształt jest zazwyczaj kulisty, jednak występują również inne formy np. nitkowate, których średnica może przekraczać 300 nm. Niektóre wydłużone postaci osiągają nawet do 1000 nm długości. Masa pojedynczego wirusa wynosi 178–200 $(\pm 22) \times 10^6$ daltonów [5, 31, 37]. Niektóre gatunki są szczególnie polimorficzne, jak np. *Aransas Bay* z rodzaju *Thogotovirus* [3]. Wirusy te są otoczone przez osłonkę lipidową, zawierającą glikoproteiny: hemaglutyninę (HA) oraz neuraminidazę (NA) (występują tylko u wirusów grypy). Tworzą one na powierzchni charakterystyczne wypustki i stanowią główne antygeny powierzchniowe. Wirus grypy A, posiada 16 podtypów HA (H1-H16) oraz 9 podtypów NA (N1-N9). Hemaglutynina, jako podstawowy antygen wirusowy, indukuje proces produkcji przeciwciał. Neuraminidaza natomiast, stanowi 7–11% wirusowego białka. Powoduje ona uwolnienie z komórek gospodarza nowo namnożonych wirusów, poprzez rozszczepienie reszty kwasu sjalowego. Wśród wirusów grypy występuje duża zmienność antygenowa, wynikająca

* Autor korespondencyjny: Kamil Leis, Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz; tel. 52 585-35-84; e-mail: kamil.leis@interia.pl

z obecności sekwencji powtarzalnych na końcach 3' oraz 5' genomu. [2, 5, 31, 37].

Wirusa typu A cechuje największa częstość mutacji, natomiast wirus typu C jest najbardziej stabilny. Mutacje te, przebiegające w obrębie antygenów, nazywane są przesunięciem antygenowym (mniejsze mutacje, powodują sezonowe epidemie) oraz skokiem antygenowym, inaczej reasortacją (większe zmiany antygenowości, powodują pandemie, tylko w wirusie grypy typu A) [2, 5, 31, 37]. W skład osłonki wchodzi również białko błonowe M2 (tylko u typu A). Pełni ono funkcję regulatorową wewnętrznego pH. Pod nim znajduje się błonowe białko M1. Warstwa tej proteiny tworzy kapsyd, otaczając rdzeń wirionu, na który składa się RNA, nukleoproteiny (NP) oraz polimerazy (złożone z dwóch podjednostek „podstawowych" oraz jednej „kwaśnej" – PB1, PB2, PA) [31, 37]. Genom posiada 6–8 segmentów, składających się z jednoniciowego antysensownego (–) RNA. Wirusy grypy A i B zawierają 8 segmentów. Wirus grypy typu C posiada ich tylko 7 [2, 28, 31, 37]. Podobnie jest z wirusem grypy typu D [21]. Thogotowirusy posiadają 6 segmentów [3, 18, 27]. Mimo, iż rodzaje *Influenza* oraz *Thogoto* różnią się pod wieloma względami, przypisano im wspólną rodzinę. Po badaniach stwierdzono, że podobieństwo wirusa *Jos* w sekwencji aminokwasów do wirusa grypy typu A wynosi 17,3%, natomiast do typu B – 16,4% a do typu C – 14,6% [6]. Analiza przeprowadzona przez innych badaczy wykazała, że podobieństwo wirusa *Upolu* do rodziny Ortomyksowirusów wynosi 75% na poziomie aminokwasów a 68% jeżeli chodzi o strukturę genomu [3].

3. Replikacja na przykładzie wirusa grypy typu A

Wirus rozpoznaje kwas sjalowy na powierzchni komórki gospodarza, po czym następuje połączenie atomu węgla tego kwasu z HA, tworząc wiązania alfa-2, 3 lub alfa-2, 6. Drugie z wymienionych wiązań jest częściej tworzone z komórkami w drogach oddechowych u człowieka. Przeciwciała skierowane przeciwko HA obniżają zakaźność wirusa. Kolejnym etapem jest endocytoza patogenu do wewnątrz komórki. Kwaśne pH, panujące wewnątrz endosomów, przyczynia się do konformacyjnych zmian w obrębie HA, w wyniku czego, odsłania się peptyd fuzyjny. Bierze on udział w połączeniu wirusa z błoną endosomalną. W wyniku tego dochodzi do otwarcia porów i uwolnienia do cytoplazmy składników wirusa. W tym samym czasie białko M2 pobiera jony wodorowe, zakwaszając od wewnątrz wirusa, co umożliwia ten proces [2]. Uwolnione z wirionu rybonukleoproteiny, są transportowane do jądra komórkowego przy udziale NLS (Nuclear Localization Sequence) – sekwencji lokalizacji jądrowej. Tam następuje transkrypcja do komplementarnej nici jako mRNA a także tworzenie kopii wirusowego RNA [2]. Proces ten zachodzi dzięki polimerazie RNA. Wirusowy ogon poliadenylowy jest kodowany jako fragmenty o wielkości 5–7 reszt uranylowych, które następnie są przekształcane przez polimerazę do dodatnich reszt adenozynowych. Po zakończonym procesie poliadenylacji odbywa się transport produktów do cytoplazmy w czym biorą udział białka M1 oraz kompleks NEP/NS2.

Białka NA, HA oraz M2 powstają na rybosomach należących do retikulum endoplazmatycznego. Stąd, są przenoszone do aparatu Golgiego, gdzie ulegają dalszemu przetworzeniu. Białko M1 bierze udział w połączeniu materiału genetycznego z białkami wirusa [2]. Wirus jest w pełni zakaźny dopiero, gdy wszystkie jego segmenty (w przypadku wirusa grypy typu A jest to 8 segmentów) są składnikami wirionu. Wcześniej uważano, że RNA pakowane jest przypadkowo, jednak dziś uważa się, że jest to proces selektywny [2]. Wiriony są uwalniane poprzez pączkowanie. Inicjacją tego procesu jest odkładanie białka M1 na warstwie lipidowej. NA usuwa cząsteczki kwasu sialowego, zapobiegając zlepianiu. Następnie glikoproteina ta może rozbijać mucynę, znajdującą się w drogach oddechowych, ułatwiając w ten sposób wnikanie do nabłonka i dalsze rozprzestrzenianie się patogenu [2]. Jeden cykl replikacyjny trwa zazwyczaj od 6 do 12 godzin, podczas którego w każdej zainfekowanej komórce powstaje ok. 1000 wirionów [37].

4. Historia

Wirusa grypy po raz pierwszy wyizolowano w 1933 roku w znajdującym się w Londynie National Institute for Medical Research. Dokonali tego Christopher Andrewes, Patrick Laidlow oraz Wilson Smith poprzez zaszczepienie zakażonej wirusem próbki w kurzych jajach [26]. Już w 1920 roku Richard Shop, badający świńską grypę, wysunął hipotezę, że za chorobę odpowiedzialny jest wirus. Zakażenia sięgają czasów antycznych. Hippokrates w 412 p.n.e. opisał jedną z pierwszych epidemii tej choroby. W XX wieku wirusy te wywołały trzy pandemie: w latach 1918–1919 pandemię „hiszpanki" (odpowiedzialny był wówczas podtyp A/H1N1), w latach 1957–1958 (podtyp A/H2N2) oraz w 1968 roku (podtyp A/H3N2). Szczepionki dopuszczono do użytku dopiero w 1941 roku. Sześć lat później, WHO podczas Kongresu Mikrobiologicznego w Kopenhadze, utworzyło Międzynarodowy Program Nadzoru nad Grypą [5, 10, 16, 24, 37].

Pierwsza pandemia XX wieku – „Hiszpanka", spowodowała na całym świecie, według obecnych szacunków, 50–100 mln ofiar śmiertelnych (według innych

danych 40–50 mln). Początek miał miejsce w Chinach lub według innych badaczy w bazach wojskowych w Stanach Zjednoczonych w marcu 1918 roku. Następne ogniska grypy wybuchły w tym samym czasie – w sierpniu 1918 w Europie, Ameryce Południowej oraz Afryce. Choroba przejawiała się obrzękiem oraz zapaleniem płuc, sinicą oraz wtórnymi zakażeniami bakteryjnymi [10, 16].

Druga pandemia, nazwana pandemią azjatycką rozpoczęła się w Chinach, w 1957 roku, rozprzestrzeniając się do Singapuru oraz Hongkongu. Wówczas po raz pierwszy wyizolowano podtyp odpowiedzialny za tę pandemię. Postać ta była szczególnie groźna dla dzieci. Uważa się, że spowodowała 1–4 mln zgonów. Mniejsza śmiertelność, w porównaniu z hiszpanką mogła być wynikiem wprowadzonych szczepionek, które nie były jeszcze dostępne podczas pierwszej pandemii [5, 10, 16, 37].

Trzecia pandemia rozpoczęła się w 1968 roku Hongkongu. Podobnie jak w przypadku drugiej pandemii, podtyp powodujący tę chorobę wyizolowano po raz pierwszy. Zachorowania dotyczyły głównie osób poniżej 20 roku życia, ponieważ starsze wytworzyły odporność podczas pandemii azjatyckiej. Spowodowała ona 1–4 mln zgonów w tym ok. 6 tys. w Polsce [5, 10, 37].

W 1997 wyizolowano po raz pierwszy wirus grypy A H5N1, zmutowanego wirusa ptasiej grypy. Dwa lata później odkryto podtyp H9N2. Oba te wydarzenia miały miejsce w Hongkongu [10].

5. Metody diagnostyczne

Grypę rozpoznaje się zazwyczaj po charakterystycznych objawach, choć często są one niespecyficzne (może je wywoływać inny patogen jak np. Adenowirusy, *Mycoplasma pneumoniae* czy syncytialny wirus oddechowy). Materiał pobiera się z nosa, nosogardzieli, gardła, płynu mózgowo-rdzeniowego. Mogą też być pomocne: materiał z biopsji, wysięk z ucha czy popłuczyny oskrzelowe. Laboratoryjnym rozpoznaniem grypy jest wyizolowanie wirusa grypy z pobranego materiału, obecność w nim specyficznych przeciwciał, antygenu lub RNA wirusa [37].

Jedną z metod diagnostycznych jest POC (testy antygenowe Point Of Care). Pozwalają ona uzyskać wyniki godzinę od chwili pobrania materiału, zaoszczędzić czas (potrzebny na hodowlę) a także zmniejszają koszty. Obecnie można dzięki nim odróżnić *Influenzavirus A* od *Influenzavirus B*. Mogą się jednak nie sprawdzać w diagnostyce wirusów odpowiedzialnych za ptasią grypę. Najbardziej wiarygodne wyniki uzyskiwane są, gdy materiał do tych testów jest pobrany w ciągu 2 dni od pojawienia się objawów. POC są natomiast przeciwwskazane u osób z symptomami utrzymującymi się dłużej niż 3 dni. Czułość tych testów wynosi 57–90% a swoistość 65–99% [26].

Do innych metod diagnostyki ortomyksowirusów możemy zaliczyć mikroskopię immunofluorescencyjną – badanie DFA (Direct Fluorescent Antibody, test bezpośredni) lub badanie IFA (immunofluorescent antibody, test pośredni). IFA jest bardziej czułe niż DFA, jednak potrzeba więcej czasu do przeprowadzenia tego testu. Metodą DFA można potwierdzić wyniki otrzymane z POC [26].

Kolejną metodą, uchodzącą długo za złoty standard [31] jest hodowla mikrobiologiczna. Patogen ten jest najczęściej izolowany z hodowli z nerek psa (linia komórkowa Madin-Darby) i zarodków kurzych, a także z nerek małpy czy nabłonka płuc norki. Po około 10–14 dniach pojawia się efekt cytopatyczny. Efekt ten może być spowodowany innym wirusem układu oddechowego, więc należy go potwierdzić metodami mikroskopii immunofluoroscencyjnej oraz poprzez zjawisko hemaadsorpcji z wykorzystaniem erytrocytów pochodzących od świnki morskiej [26, 31, 37].

Do wykrywania ortomyksowirusów stosuje się również metody molekularne. Należą tutaj RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) lub RT-qPCR (Real Time PCR). Metodami tymi łatwiej można zdiagnozować wirusa u osób z przeszczepionym narządem lub przewlekłą chorobą płuc, ze względu na bardzo wysoką czułość metody, sięgającą 97–99% [26, 31].

Innymi metodami wykrywania obecności patogenu w organizmie są testy serologiczne: NT (Neutralizing Techniques), wiązanie dopełniacza, HI (hemagglutination-inhibition), immunoflorescencyjna mikroskopia oraz EIA (Enzyme Immunoassay). Opierają się one na pojawieniu się przeciwciał przeciwko wirusowi po 2 tygodniach od infekcji, osiągających maksymalne stężenie po 4–7 tygodniach. Nie są powszechnie stosowane [26]. Jedną z najczęściej stosowanych metod są natomiast szybkie testy przeglądowe [31].

6. Chorobotwórczość

6.1. Grypa – wirusy Influenza

Wirus grypy typu A występuje u ssaków (świń, koni, również ludzi) oraz ptaków, wirus grypy typu B wyłącznie u ludzi a wirus typu C – u ludzi oraz świń [31, 37]. Zakażenie przenosi się drogą kropelkową (kichanie, kaszel osoby zainfekowanej, bezpośredni kontakt z osobą zainfekowaną lub ze skażonym materiałem). Wirus grypy atakuje komórki nabłonkowe układu oddechowego. W rozprzestrzenianiu pomaga neuraminidaza – rozrzedza śluz, ułatwiając jego spływanie w dół drzewa oskrzelowego. Wirus grypy spra-

wia, że następuje martwica komórek rzęskowych oraz komórek kubkowych w górnych drogach oddechowych. Sprzyja to inwazji bakterii takich jak np. *Staphylococcus aureus* czy *Streptococcus pneumoniae* [37]. Następuje okres inkubacji wirusa, trwający zwykle 2 dni. Po nim występują: dreszcze, gorączka (u dzieci nawet do 40°C), ból gardła, katar, kaszel, ból głowy, ból mięśni, biegunka i wymioty. Dolegliwości gastryczne są rzadkie u osób dorosłych, jednak bardzo często obserwuje się je u dzieci. Symptomy te utrzymują się około 2 tygodnie. Infekcja wirusem grypy pogarsza przebieg innych współistniejących chorób [37].

Grypie często towarzyszą powikłania. Należą do nich: zapalenie płuc i oskrzeli głównie o etiologii *S. aureus*, *S. pneumoniae* oraz *Haemophilius influenzae*, odrzucenie przeszczepu, zapalenie ucha środkowego, zespół Reye'a, mioglobinuria, niewydolność nerek, zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie mózgu, zapalenie opon mózgowych, zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia schizofrenii, jeśli przebiega w czasie ciąży i dojedzie do wewnątrzmacicznej infekcji, nasilenie padaczki, toksyczna encefalopatia, psychozy, wylewy podpajęczynówkowe. U dzieci obserwuje się również zespół Guilliana-Barrego, upośledzenie słuchu, prowadzące niekiedy do głuchoty, zaburzenia w obrębie przewodu pokarmowego, zaostrzenie przebiegu astmy [4, 33, 37].

Szczególnie narażeni na powikłania pogrypowe są biorcy narządów, kobiety w ciąży, osoby w wieku 6–18 lat leczone kwasem acetylosalicylowym, chorzy na choroby układu oddechowego lub sercowo-naczyniowego a także choroby nerwowo-mięśniowe. W grupie ryzyka są również osoby po 50 r.ż. lub w 6–59 miesiącu życia oraz pracownicy opieki zdrowotnej [37]. Zakażenia wirusami grypy są znacznie częstsze oraz groźniejsze – mogące się zakończyć nawet śmiercią – u osób z obniżoną odpornością (np. w przebiegu różnych jednostek chorobowych jak AIDS lub infekcji cytomegalowirusem, który również powoduje osłabienie układu odpornościowego) [31, 34, 35]. Objawy u tych osób utrzymują się dłużej niż u immunokompetentnych. Także powikłania występują z większą częstotliwością.

6.2. *Thogotovirus*

Do rodzaju *Thogotovirus* zalicza się następujące gatunki: *Aransas Bay*, *Araquari*, *Apia*, *Bakten*, *Bourbon*, *Dhori*, *Jos*, *Thogoto* oraz *Upolu*. Jedynie trzem ostatnim przypisuje się wywoływanie chorób u człowieka. Glikoproteiny rodzaju *Thogotovirus* mają inną budowę niż wirusy grypy, zbliżoną do glikoprotein Bakulowirusów [3].

Aransas Bay odkryty w Texasie, w Stanach Zjednoczonych, nie ma udowodnionego występowania w naturze u kręgowców [3].

Wirus *Araquari* po raz pierwszy wyizolowany z narządów wewnętrznych *Philander opos sum* – oposa szarego w Brazylii. Podobnie jak poprzednio opisane gatunki, ten również nie wywołuje chorób u człowieka [27].

Wirus *Batken* został wyizolowany z komarów oraz kleszczy *Hyalomma plumbeum plumbeum* (we wsi Batken, stąd nazwa patogenu). Nie stwierdzono jednak występowania tego gatunku u człowieka [13].

Wirus *Bourbon* został wyizolowany w 2014 roku u 50-letniego, zdrowego mężczyzny. Kilka dni po ugryzieniach kleszczy dostał on biegunki, pojawiło się osłabienie oraz nudności, w późniejszej fazie choroby także gorączka, bóle głowy, mięsni oraz stawów. Zastosowano u niego doksycyklinę, jednak ta nie przynosiła poprawy. W późniejszym okresie stwierdzono leukocytopenię oraz trombocytopenię. Rozwinęła się duszność, niewydolność nerek oraz kwasica mleczanowa. Wystąpił również częstoskurcz komorowy i niedociśnienie, na wskutek czego, po 11 dniach od zaobserwowania pierwszych objawów, pacjent zmarł. Po badaniach stwierdzono, że przyczyną choroby jest nowy wirus, podobny do *Dhori* oraz *Batk*en, który zawdzięcza swoją nazwę stanowi Bourbon, w którym się pojawił [7, 19].

Wirus *Dhori* pobrany został po raz pierwszy z kleszczy *Hyalomma dromedarii*, których żywicielami były wielbłądy. Występuje w Europie, Azji Środkowej i Afryce u wielu zwierząt (np. konie, kozy). U człowieka wywołuje ból głowy, ból mięśni, osłabienie oraz objawy ze strony układu nerwowego [22]. Wirus *Jos* po raz pierwszy został wyizolowany w 1967 roku z surowicy krowy (przenoszony również przez kleszcze), w Jos, w Nigerii. Następnie stwierdzano przypadki jego występowania w wielu krajach afrykańskich. Ze względu do *Thogoto* i *Dhori*, wirus ten powinien być uważany za potencjalnie chorobotwórczy dla człowieka. Jednak, jak w przypadku *Bakten* nie stwierdzono zakażenia u ludzi [6].

Thogotovirus jest typowym gatunkiem swojego rodzaju. Został on po raz pierwszy zaobserwowany w lesie Thogoto. Wektorami są kleszcze *Rhipicephalus*, *Boophilus*, *Amblyomma* i *Hyalomma*. Występuje u wielu zwierząt: myszy, mangusty pręgowanej, bydła, wielbłądów, psów, kotów, zająców, owiec a także u ludzi. Jego obecność stwierdzono w południowej części Europy, Afryce oraz ma Bliskim Wschodzie [11, 15, 18, 25].

6.3. *Isavirus*

Należący również do rodziny Ortomyksowirusów, rodzaj *Isavirus*, posiada tylko jeden gatunek o tej samej nazwie, wywołujący chorobę łososi (Infectious salmon anaemia). Zakażenie wykryto w wielu miejscach (np. Kanada, Wielka Brytania). Nie udokumentowano jednak choroby u dzikiego łososia. Stwierdzono za to

przypadki zakażenia pstrąga tęczowego. Ryby przenoszą patogen poprzez kopulacje lub kontakt ze skażonym materiałem biologicznym. Uważa się, że wirus może przenosić się w wodzie na dużą odległość. Osobniki, które przeżyły infekcję, posiadają wysokie miano przeciwciał przeciwko temu patogenowi. Choroba objawia się leukopenią, anemią, martwicą wątroby oraz nerek, przekrwieniem narządów. Może również przebiegać bezobjawowo [8, 29, 30, 32].

6.4. *Quaranjavirus*

Do rodziny *Quaranjavirus* należą gatunki: *Tyulek*, *Lake Chad*, *Johnston Atol*, *Cygnet River*, *Wellfleet Bay i Quaranfil*. Jedynie ten ostatni wywołuje choroby u ludzi.

Quaranfil został po raz wykryty w Egipcie, u dzieci z występującą gorączką. Kilka lat później, po przebadaniu lokalnego społeczeństwa, stwierdzono, że aż 8% posiadało przeciwciała przeciwko temu patogenowi. Podobne przypadki wykryto w Afryce oraz na Bliskim Wschodzie. Nie został jeszcze poznany mechanizm chorobotwórczości ani możliwe objawy kliniczne. Wiadomo natomiast, że przenosi się poprzez kleszcze *Argas arboreus* [28].

Wirus *Tyulek* występuje za to u kleszczy *Argas vulgaris* [20], *Lake Chad* u ptaków *Ploceus vitellinus* [28], *Johnston Atol* u kleszczy *Ornithodoros capensis* i myszy [28], *Cygnet River* (odkryty dopiero w 2010 roku w Australii) u kaczek piżmówek [17] a *Wellfleet Bay* u kaczek edredonowych (*Somateria mollissima*) [1].

Oprócz tego wirusy z rodziny *Orthomyxoviridae* mogą inicjować u ludzi procesy neurodegeneracyjne i zwiększać ryzyko wystąpienia schizofrenii [33, 35].

7. Leczenie

Leki przeciwko grypie możemy podzielić na dwie kategorie: starej generacji oraz nowej generacji. Substancje te są pomocne nie tylko w leczeniu symptomów obecnej już choroby, lecz także w jej profilaktyce. Pierwszą z nich jest grupa leków działająca hamująco na białko M2. Są one skuteczne jedynie w przypadku wirusa grypy typu A, ponieważ jako jedyny posiada to białko. Należą tutaj amantadyna oraz rymantadyna [4, 31, 37]. Druga grupa leków przeciwgrypowych to inhibitory glikoproteiny-neuraminidazy. Są one skuteczne także przy typie B wirusa. Leki te, do których zalicza się oseltamiwir oraz zanamiwir, działają na zasadzie kompetencji, wypierając kwas sialowy, który ma mniejsze powinowactwo do neuraminidazy [4, 31, 37].

W 2015 roku opublikowano wyniki badania, dotyczącego oseltamiwiru. 4328 dorosłych chorych podzielono na dwie grupy. Jedna przyjmowała placebo a druga 75 mg dwa razy dziennie. Stwierdzono, że lek ten zmniejsza ryzyko powikłań i skraca czas występowania objawów. Powoduje jednak wymioty oraz nudności [12]. Preparat można stosować od 1 r.ż. Jest także dozwolony u kobiet w ciąży [23]. W 2016 roku Chamara i wsp. ogłosili wyniki analiz, dotyczących wpływu kortykosteroidów na przebieg grypy. Okazał się być negatywny – zwiększało się ryzyko zakażeń oraz śmiertelność [9].

8. Szczepionki

Szczepionki możemy podzielić na m.in. szczepionki żywe, szczepionki zawierające rozszczepiony wirion (split) czy szczepionki podjednostkowe (subunit). Szczepionki żywe otrzymuje się z mutantów. W Polsce otrzymano dwa takie mutanty. Są to A/Pol/L/71 /H3N2/ oraz A/Pol/79/85. Najlepsze efekty szczepienia dają mutanty wirusowe zaadaptowane do niskich temperatur tzw. mutanty cold added oraz szczepy wyizolowane z ptaków. Szczepionki z tych pierwszych przygotowuje się na zasadzie przystosowywania patogenów do niskich temperatur (25°C), co powoduje, że przy temperaturze ok. 37°C drobnoustroje nie są szkodliwe dla organizmu człowieka.

Innym rodzajem szczepionek są szczepionki typu „split", tj. takie, które mają rozszczepiony wirion. Należą one do szczepionek inaktywowanych (które mogą zawierać adiuwanty lub nie), w odróżnieniu do wcześniej omawianych szczepionek żywych nie zawierają aktywnych wirusów. Do szczepionek inaktywowanych należą także szczepionki typu „subunit". Składają się one jedynie z powierzchniowych białek wirusowych i określane są mianem szczepionek podjednostkowych [4, 5].

Szczepionki są aktualizowane z sezonu na sezon, ponieważ wirusy wywołujące grypę podlegają ewolucji. Global Influenza Vaccine Effectiveness Collaboration prowadzi badania dotyczące ich skuteczności w danym sezonie a GISRS (Global Influenza Surveillance and Response System) porównuje sekwencje genowe patogenów znajdujących się w obiegu oraz tych, zawartych w szczepionkach a także analizuje białka powierzchniowe pod kątem możliwej odpowiedzi odpornościowej. WHO publikuje rekomendacje dotyczące półkuli północnej w lutym lub marcu, natomiast dotyczące półkuli południowej we wrześniu. Wynika to z czasu potrzebnego na wytworzenie szczepionek. Proces ten polega na ich hodowli w kulturach komórkowych, kurzych jajach lub rekombinowanym białku [36].

Wg zaktualizowanych z sezonu 2015/2016 wytycznych przez ACID, w sezonie 2016/2017 stosowano szczepionkę, zawierającą antygeny następujących szczepów (lub szczepów z nimi spokrewnionych): A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) i B/Brisbane/60/2008. Oprócz tego istnieje

także szczepionka czterowalentna. Zawiera ona oprócz wyżej wymienionych B/Phuket/3073/2013 (linia Victoria) [14]. W sezonie 2017/2018 rekomendowane są szczepionki zawierające antygeny szczepów: A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm, A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) oraz B/Brisbane/60/2008. Szczepionki czterowalentne natomiast powinny zawierać oprócz wymienionych również B/Phuket/3073/2013 lub B/Yamagata [36]. Nie rekomenduje się stosowania LAIV4 [14]. Coroczne szczepienie zaleca u wszystkich osób powyżej 6 m.ż., u których nie ma do tego przeciwwskazań [14].

9. Podsumowanie

Rodzina wirusów *Orthomyxoviridae* nie jest jeszcze w pełni poznana. Cały czas odkrywane są nowe gatunki (wirus *Bourbon* odkryty został dopiero w 2014 roku), które po analizie dołączane są właśnie do tej grupy. Trwają także prace nad leczeniem oraz szczepionkami. Najbardziej znany rodzaj z tej rodziny tj. wirusy grypy, stanowi globalny problem, powodując co roku mnóstwo zachorowań, z których część kończy się zgonami. Co roku z powodu wysokiej zmienności genetycznej wirusa grypy są publikowane nowe, uaktualniane wytyczne, dotyczące szczepionek.

Piśmiennictwo

1. Allison A.B., Dwyer C. i wsp.: Cyclic Avian Mass Mortality in the Northeastern United States Is Associated with a Novel Orthomyxovirus. *J. Virol.* **89**, 1389–1403 (2015)
2. Bouvier N. M., Palese P.: The Biology of influenza virus. *Vaccine*, **26**, 49–53 (2008)
3. Briese T., Chowdhary R., Travassos da Rossa A., Hutchinson S.K., Popov V., Street C., Tesh R.B., Lipkin W.I.: *Upolu virus* and *Aransas Bay* virus. Two presumptive bunyaviruses, are novel members of the family *Orthomyxoviridae*, *J. Virol.* **88**, 5298–5309 (2014)
4. Brydak L.B.: Grypa chorobą rodziny, *Fam. Med. Prim. Care Rev.* **13**, 281–286 (2011)
5. Brydak L.B.: Grypa – problem stary jak świat. *Hygeia Public Health*, **47**, 1–7 (2012)
6. Bussetti A.V., Palacios G., Travassos da Rosa A., Savji N., Jain K., Hutchison S., Popov V. L., Tesh R. B., Lipkin W. I.: Genomic and antigenic characterization of *Jos* virus. *J. Gen. Virol.* **93**, 293–298 (2012)
7. Centers for Disease Control and Prevention Cdc.gov/Bourbon virus (01.03.2017)
8. Cipriano R.C.: Antibody against infectious salmon anaemia virus among feral Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Mar. Sci.* **66**, 865–870 (2009)
9. Cochrane org. / Corticosteroids as adjunctive therapy In the treatment of influenza (01.03.2017)
10. Cox N.J., Subbarao K.: Global epidemiology of influenza: Past and present. *Annu. Rev. Med.* **51**, 407–421 (2000)
11. Davies C.R., Jones L. D., Green B. M., Nuttall P. A.: In vivo Reassortment of Thogoto Virus (a Tick-borne Influenza-like Virus) following Oral Infection of *Rhipicephalus appendiculatus Ticks. J. Gen. Virol.* **68**, 2331–2338 (1987)
12. Dobson J., Whitley R.J., Pocock S., Monto A.S.: Oseltamiwir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Lancet*, **385**, 1729–1737 (2015)
13. Frese M., Weeber M., Weber F., Speth V., Haller O.: Mx1 sensitivity: Batken virus is an orthomyxovirus closely related to Dhori virus. *J. Gen.Virol.* **78**, 2453–2458 (1997)
14. Grohskopf L., Sokolov L. Z., Broder K.R., Olsen S. J., Karron R.A., Jernigan D.B., Bresee J.S.: Prevention and control of influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2016–17 Influenza Season. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **65**, 1–54 (2016)
15. Haig D.A., Woodall J.P., Danskin D.: Thogoto Virus: a Hitherto Undescribed Agent Isolated from Ticks in Kenya. *J. Gen. Microbiol.* **38**, 389–394 (1965)
16. Juozapaitis M., Antoniukas L.: Influenza virus. *Medicina* (*Kaunas*), **43**, 919–929 (2007)
17. Kessel A., Smith I. i wsp.: Cygnet River Virus, a novel Orthomyxovirus from ducks, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 2044–2046 (2012)
18. Kochs G., Bauer S., Vogt C., Frenz T., Tschopp J., Kalinke U., Waibler Z.: Thogoto virus infection induces sustained type I interferon responses that depend on RIG-I-Like helicase signaling of conventional dendritic cells. *J. Virol.* **84**, 12344–12350 (2010)
19. Kosoy O.I., Lambert A.J., Hawkinson D.J., Pastula D.M., Goldsmith C.S., Hunt D.C., Staples J.E.: Novel Thogotovirus associated with febrile lllness and death, United States, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 760–764 (2015)
20. L'vov D.K., Al'khovskiĭ S.V., Shchelkanov M., Shchetinin A.M., Deriabin P.G., Aristova V.A., Gitel'man A.K., Samokhvalov E.I., Botikov A.G.: Taxonomic status of the Tyulek virus (TLKV) (Orthomyxoviridae, Quaranjavirus, Quaranfil group) isolated from the ticks Argas vulgaris Filippova, 1961 (Argasidae) from the birds burrow nest biotopes in the Kyrgyzstan. *Vopr. Virusol.* **59**, 28–32 (2014)
21. Markowska-Daniel I., Mickiewicz M., Witkowski L., Kita J.: Charakterystyka nowego wirusa grypy typu D, *Med. Weter.* **72**, 531–535 (2016)
22. Mateo R.I., Xiao S., Lei H., Travassos da Rossa A.P.A., Tesh R.B.: Dhori virus (*Orthomyxoviridae*: Thogotovirus) infection in mice: A model of pathogenesis of severe orthomyxovirus infection, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **76**, 785–790 (2007) [dhori]
23. Medycyna Praktyczna Mp.pl/ Oseltamiwir (opis profesjonalny) (01.03.2017)
24. Nakajima K.: History of influenza virus research Japanese. *J. Clin. Med.* **64**, 1774–1780 (2006)
25. Ogen-Odoi A., Miller B.R., Happ C.M., Maupin G.O., Burkot T.R.: Isolation of Thogoto virus (*Orthomyxoviridae*) from the nanded moongose *Mongos mungo* (*Herpestidae*), in Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**, 439–440 (1999)
26. Petric M., Comandor L., Petti C. A.: Role of the labolatory in diagnosis of infuenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J. Infect. Dis.* **194**, 98–110 (2006)
27. Pinto da Silva E.V., Travassos da Rossa A.P.A., Nunes M.R.T., Diniz J.A.P., Tesh R.B., Cruz A.C.R., Vieira C.M.A., Vasconcelos P.F.C.: Araguari virus, a new member of the family *Ortomyxoviridae*: Serologic, ultrastructural, and molecular characterization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**, 1050–1058 (2005)
28. Presti R.M., Zhao G., Beatty W.L., Mihindukulasuriya K.A., Travassos da Rossa A.P.A., Popov V.L., Tesh R.B., Virgin H.V., Wang D.: Quaranfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family *Orthomyxoviridae*. *J. Virol.* **83**, 11599–11606 (2009)
29. Rolland J.B., Winton J.R.: Relative resistance of Pacific salmon to infectious salmon anaemia virus. *J. Fish Dis.* **26**, 511–520 (2003)

30. Ruszczyk A.: Zakaźna anemia łososi. *Życie Wet.* **79**, 540–545 (2004)
31. Stefańska I., Dzieciątkowski T., Młynarczyk G.: Zakażenia ortomyksowirusami u osób z zaburzeniami odporności. *Post. Mikrobiol.* **51**, 99–108 (2012)
32. Vike S., Oelckers K., Duesund H., Erga S.R., Gonzalez J., Hamre B., Frette O., Nylund A.: Infectious salmon anemia (ISA) virus: infectivity in seawater under different physical conditions. *J. Aquat. Anim. Health*, **26**, 33–42 (2014)
33. 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)
34. 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)
35. Wiciński M., Sopońska P., Brzoszczyk B., Malinowski B., Grześk E., Michalska A.: Rola czynników zakaźnych w chorobach neurodegeneracyjnych. *Post. Mikrobiol.* **52**, 93–103 (2013)
36. World Health Organization, http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/candidates_reagents/201703_qanda_recommendation.pdf?ua=1 (25.01.2018)
37. Życińska K., Brydak L. B.: Grypa i jej profilaktyka – ciągle aktualny problem medyczny. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **117**, 464–469 (2007)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 145–155
http://www.pm.microbiology.pl

ZAKAŻENIA GAMMAHERPESWIRUSAMI U OSÓB Z UPOŚLEDZENIEM ODPORNOŚCI

Anna Żuk-Wasek[1], Maciej Przybylski[2]*, Natalia Żeber[2], Grażyna Młynarczyk[2], Tomasz Dzieciątkowski[2]

[1] Zakład Mikrobiologii Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie
[2] Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wpłynęło w październiku 2017 r., zaakceptowano w styczniu 2018 r.

Streszczenie: Ludzki herpeswirus typu 4 (HHV-4), znany także jako wirus Epsteina-Barr (EBV) oraz ludzki herpeswirus typu 8 należą do podrodziny *Gammaherpesvirinae*. Oba wirusy mają zdolność ustanawiania latencji w limfocytach B. Zakażenia przez nie wywoływane mają najczęściej łagodny przebieg i samoograniczający charakter, jednak u osób z upośledzeniem odporności mogą wywoływać schorzenia o ciężkim przebiegu. Niedobory odporności mogą prowadzić do zmian nowotworowych związanych z zakażeniami powodowanymi przez gammaherpeswirusy. Dotyczy to zarówno osób poddanych immunosupresji w związku z zabiegami przeszczepienia, jak i osób zakażonych wirusem upośledzenia odporności, u których występuje współzakażenie EBV lub HHV-8. Wirus Epsteina-Barr związany jest także z groźnymi zakażeniami u ludzi obarczonych pewnymi wrodzonymi zespołami niedoborów odporności. W prezentowanym artykule zamieszczono informacje na temat epidemiologii, patogenezy, objawów klinicznych oraz leczenia zakażeń EBV i HHV-8 u osób z upośledzeniem odporności.

1. Wstęp. 2. Zakażenia gammaherpeswirusami u osób z HIV/AIDS. 2.1. Chłoniak Burkitta. 2.2. Inne chłoniaki związane z EBV. 2.3. Mięsak Kaposiego. 2.4. Wieloogniskowa choroba Castlemana. 2.5. Pierwotny chłoniak wysiękowy jam surowiczych. 3. Zakażenia gammaherpeswirusami u osób poddanych immunosupresji. 3.1. Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna. 3.2. Limfohistiocytoza hemofagocytarna. 3.3. Chłoniak Hodgkina, 3.4. Zakażenia KSHV. 4. Zakażenia gammaherpeswirusami we wrodzonych zespołach niedoborów odporności. 5. Podsumowanie

Gammaherpesviral infections in patients with immunological disorders

Abstract: Human herpes virus type 4 (HHV-4), commonly known as Epstein-Barr virus (EBV), and human herpes virus type 8 (HHV-8) are members of *Gammaherpesvirinae* subfamily. They both develop latent infections in B lymphocytes. Infection with these viruses in immunocompetent patients is usually mild and self-limiting, but it can have more severe course in immunocompromised individuals. Failure of the immune system often leads to oncogenesis related to gammaherpetic infection. Thus, immunocompromised patients are far more likely to develop proliferative diseases caused by EBV or HHV-8. This problem also applies to HIV-positive individuals co-infected with EBV or HHV-8. Gammaherpesviruses can also be the cause of post-transplantation issues in patients on immunosuppressive drugs and EBV is known to induce severe clinical syndromes in people with specific genetic disorders. Presented article summarizes epidemiology, pathogenesis, clinical syndromes and treatment of EBV and HHV-8 in individuals with immunological disorders.

1. Introduction. 2. Gammaherpetic infections in patients with HIV/AIDS. 2.1. Burkitt's lymphoma. 2.2. Other lymphomas associated with EBV, 2.3. Kaposi sarcoma, 2.4. Multicentric Castleman's disease. 2.5. Primary effusion lymphoma. 3. Gammaherpetic infections in immunosuppressed individuals. 3.1. Post-transplant lymphoproliferative disease. 3.2. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. 3.3. Hodgkin lymphoma. 3.4. KSHV infections. 4. Gammaherpetic infections in intrinsic immune deficiency syndromes. 5. Summary

Słowa kluczowe: gammaherpeswirusy, HHV-4, HHV-8, niedobory odporności, immunosupresja
Key words: gammaherpesviruses, HHV-4, HHV-8, immune deficiency, immunosuppression

1. Wstęp

Do rodziny *Herpesviridae* należą duże, osłonkowe wirusy o ikosaedralnej budowie kapsydu, których materiałem genetycznym jest dwuniciowe DNA. Dotychczas opisano 89 gatunków herpeswirusów, z których dziewięć jest typowymi patogenami człowieka. Charakterystyczną cechą herpeswirusów jest zdolność do ustalania stanu latencji w komórkach gospodarza i reaktywacji zakażenia. Podzielono je na trzy podrodziny: *Alpha-*, *Beta-* i *Gammaherpesvirinae*. Znane są dwa gammaherpeswirusy chorobotwórcze dla człowieka: wirus Epsteina-Barr (EBV – Epstein-Barr Virus, HHV-4, gatunek: *Human gammaherpesvirus 4*) oraz wirus związany z mięsakiem Kaposiego (KSHV – Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus, HHV-8, gatunek: *Human gammaherpesvirus 8*). Oba wirusy zdolne są do ustalania stanu latencji w ludzkich limfocytach i do pobudzania ich proliferacji [83]. Historia ich odkrycia związana jest z badaniami nad nowotworami: w przypadku EBV nad chłoniakiem Burkitta [34], zaś w przypadku KSHV – nad mięsakiem Kaposiego [20].

Związek wirusa Epsteina-Barr z rozwojem nowotworów znany jest od dawna. W 1964 roku Michael Epstein i Yvonne Barr wyprowadzili linię komórkową z biopsji chłoniaka Burkitta (BL) i wykryli w niej

* Autor korespondencyjny: dr n. med. Maciej Przybylski, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel.: 22 599 17 74, e-mail: maciej@conexion.pl

wirusa, który od ich nazwisk został nazwany wirusem Epsteina-Barr [33]. Znane są dwa typy herpeswirusa 4: EBV-1 i EBV-2 (określane również czasem jako A i B). Różnią się one pomiędzy sobą regionem kodującym antygen jądrowy wirusa Epsteina-Barr (EBNA) [39]. EBV-1 dominuje w Europie, zaś EBV-2 wywołuje zakażenia przede wszystkim w centralnej części Afryki i na Nowej Gwinei. Występowanie zakażeń EBV-2 jest dużo częstsze u osób z HIV niż w ogólnej populacji. Oba typy mogą powodować jednoczesne zakażenie u tej samej osoby [88].

Genom EBV stanowi cząstka dwuniciowego, liniowego DNA długości 172 kbp, kodującego ponad 85 genów. Dzieli się ona na domeny długie (UL – Long Unique sequence domain) i krótkie (US – Short Unique sequence domain), zawierające fragmenty powtórzone wewnętrznie (IRs – Internal Repeat sequence) oraz terminalnie (TRs – Terminal Repeat sequence) [96]. Po wniknięciu do komórki gospodarza i uwolnieniu nukleokapsydu do cytoplazmy, DNA wirusa transportowane jest do jądra komórkowego. W zakażonej komórce genom wirusa przyjmuje zazwyczaj formę pozachromosomalnego, kolistego episomu, która związana jest z fazą latentną. Może też czasami ulegać integracji z chromosomami w formie linearnego DNA i ta forma związana jest z fazą lityczną wirusa. [51].

Według różnych źródeł, zakażonych EBV jest 90–95% populacji na całym świecie. Główną drogą zakażenia jest droga kropelkowa, rzadziej przetoczenie krwi lub preparatów krwiopochodnych oraz zabiegi transplantacyjne. Zakażenie pierwotne następuje w jamie nosowo-gardłowej, gdzie EBV zakaża komórki nabłonkowe. Następnie wirus transportowany jest do okolicznych skupisk tkanki chłonnej, gdzie zakażać może limfocyty B; zdecydowanie rzadziej wirus zakaża limfocyty T bądź komórki NK. W ponad 50% przypadków, z reguły u dzieci, pierwotne zakażenie jest bezobjawowe lub przebiega łagodnie. W krajach rozwiniętych do zakażenia pierwotnego często dochodzi w wieku młodzieńczym i wówczas może ono przybierać postać pełnoobjawowej mononukleozy zakaźnej (IM – Infectious Mononucleosis); okres inkubacji wynosi od 30 do 50 dni [30]. Całkowite wyzdrowienie następuje zwykle po około 3 tygodniach. Należy jednak pamiętać, że odpowiedź immunologiczna – humoralna i komórkowa – nie eliminuje wirusa z organizmu, po zakażeniu pozostaje populacja limfocytów B zawierających latentną formę wirusa, którego genom w postaci episomu znajduje się w jądrze komórkowym, podlega replikacji wspólnie z komórkowym DNA i jest dziedziczony przez komórki potomne. Genom EBV koduje zestaw białek, które wykazują homologię do wielu komórkowych białek o charakterze antyapoptycznym, cytokin i transduktorów sygnałów w komórce oraz białka, które wchodzą z nimi w interakcje, przez co promują infekcję EBV, a także immortalizację, proliferację i transformację komórki. W cyklu litycznym ekspresji ulega ponad 80 genów wirusa, podczas gdy w czasie cyklu latentnego ma miejsce synteza tylko części białek wirusowych: sześciu antygenów jądrowych (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, LP), trzech białek membranowych (LMP-1, -2A i -2B) oraz dwóch małych fragmentów RNA (EBERs-1 i -2). Ograniczenie ekspresji genów w fazie latencji jest prawdopodobnie jednym z głównych mechanizmów ucieczki wirusa przed mechanizmami obrony immunologicznej [70]. W ustalaniu latencji biorą udział białka: EBNA-1, EBNA-2 i LMP-1, przy czym kluczowe jest EBNA-2, które wraz z EBNA-1 stymuluje promotor LMP-1 [43, 96].

W zależności od ekspresji antygenów wyróżniamy cztery typy latencji EBV [97]. W przypadku latencji typu 0 większość limfocytów spoczynkowych pamięci nie wykazuje ekspresji żadnych antygenów wirusowych, co pozwala im pozostać niewidocznymi dla systemu immunologicznego gospodarza. Typ I latencji związany z ekspresją EBNA-1 i EBERs jest obserwowany w krążących komórkach B podczas ich podziału oraz w chłoniaku Burkitta. W typie II latencji obok EBNA-1 i EBERs ulegają ekspresji także LMP-1 i LMP-2. Ten typ latencji występuje w przypadku raka jamy nosowo-gardłowej, raka żołądka, choroby Hodgkina i chłoniaka z komórek T. W najbardziej immunogennym typie III latencji dodatkowo wykrywane są białka z rodziny EBNA 3 (-3A, -3B i -3C). Dzieje się tak w przypadku pacjentów poddanych immunosupresji, u których rozwinęła się potransplantacyjna choroba limfoproliferacyjna (PTLD – Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder) oraz u chorych na AIDS, u których stwierdzono chłoniaka [42, 43, 46].

Ludzki herpeswirus typu 8, nazywany też wirusem związanym z mięsakiem Kaposiego jest jedynym przedstawiam rodzaju *Rhadinovirus*, który wywołuje zakażenia u człowieka. Na podstawie różnic w sekwencjach genów ORF-K1 i ORF 15 wyróżnia się pięć serotypów wirusa (od A do E), o różnym rozmieszczeniu geograficznym i zbliżonej chorobotwórczości [1]. Znane są trzy choroby, których etiopatogeneza związana jest z infekcją HHV-8. Są nimi: mięsak Kaposiego (MK), rzadka odmiana chłoniaka z limfocytów B znana pod nazwą pierwotnego chłoniaka wysiękowego (PEL – Primary Effusion Lymphoma) lub chłoniaka lokującego się w jamach ciała (BCBL – Body Cavity Based Lymphoma) oraz wieloogniskowa choroba Castlemana (MCD – Multicentric Castleman's Disease) [76]. Wyniki badań seroepidemiologicznych wskazują, że przeciwciała przeciwko HHV-8 występują u około 70–100% chorych na mięsaka Kaposiego i tylko 2% populacji ogólnej [101]. Wykazano również znaczną różnicę w odsetku osób serododatnich w zależności od grupy etnicznej, a nawet stylu życia. W ogólnej

populacji krajów europejskich, USA, Kanady i Australii, zakażenie dotyczy około 5% populacji, natomiast w wybranych regionach południowej Europy (południe Włoch, Albania, Grecja) osiąga 20–30%, a w rejonach o wysokiej zapadalności (Sycylia) nawet 70% dorosłej populacji ma przeciwciała przeciwko HHV-8 [14]. W regionach podzwrotnikowych i okołorównikowych Afryki odsetek osób serododatnich przekracza 50%, natomiast w populacji zakażonych HIV-1 homoseksualistów zamieszkałych w Europie i USA wynosi 30–75% [85, 99]. Dla kontrastu, w dorosłej populacji Japonii, przeciwciała przeciw HHV-8 wykrywa się u 0,2% [36]. Za główną drogę przenoszenia wirusa, szczególnie w populacji HIV-dodatniej, uznaje się kontakty homoseksualne, podczas gdy transmisja drogą heteroseksualną pozostaje nadal kwestią dyskusyjną [68]. W regionach endemicznych HHV-8 przenosi się głównie za pośrednictwem śliny, a zakażenia pierwotne dotyczą przede wszystkim dzieci, zakażających się od rodziców i rodzeństwa [27]. Udowodniono ponadto, że wirus może przenosić się drogą wertykalną, jak również poprzez krew i produkty krwiopochodne [47]. Zespół kliniczny związany z zakażeniem pierwotnym nie został do tej pory jednoznacznie opisany. Najprawdopodobniej jest on w większości przypadków bezobjawowy lub też towarzyszą mu objawy nieswoiste. Zakażenie pierwotne HHV-8 stwierdzane u osób poddanych immunosupresji lub zakażonych HIV, przebiega z limfadenopatią, hepatomegalią, zapaleniem stawów, pancytopenią, uszkodzeniem szpiku oraz pojawieniem się zlokalizowanych ognisk mięsaka Kaposiego [62, 74]. W obu grupach w okresie objawowym wykrywa się DNA wirusa w ślinie, we krwi lub w tkankach, a po 3–6 tygodniach następuje serokonwersja. Mimo bardzo ograniczonej liczby obserwacji sugeruje to, że HHV-8, podobnie jak pozostałe herpeswirusy, powoduje zakażenia pierwotne o lekkim i samoograniczającym się charakterze u osób immunokompetentnych, natomiast u osób z niedoborami odporności przybierają one formę ciężką i związaną z ryzykiem poważnych następstw [17].

HHV-8 może zakażać różne typy komórek: śródbłonek naczyń krwionośnych i limfatycznych, limfocyty T CD8+, limfocyty B, makrofagi, keratynocyty i komórki nabłonka gruczołowego [40]. Po zakażeniu wirus pozostaje w komórce gospodarza w postaci episomalnej (która związana jest z cyklem latentnym) i jest przekazywany do komórek potomnych podczas replikacji. W latencji ekspresja genów wirusowych ograniczona jest zaledwie do kilku: LANA (Latency-Associated Nuclear Antygen, ORF73), wirusowej cykliny (vCyclin, ORF72), wirusowego FLIP (vFLIP, ORF71) i mikroRNA, a także białek z rodziny kaposin (ORF K12), regulujących transformację komórek i hamujących apoptozę. W komórce zakażonej latentnie znajduje się od 100 do 150 episomów HHV-8, związanych z chromosomalnym DNA gospodarza. Podczas reaktywacji ekspresji ulega pełen zestaw genów wirusowych takich jak: ORF50, ORF57, ORF59, ORF40, ORF6, ORF9, K8, wirusowy homolog interleukiny 6 (vIL-6, ORFK2), wirusowe białko G związane z receptorem (vGPCR, ORF74) oraz wirusowe homologi chemokin vCCL-1 (ORFK6) i vCCL-2 (ORFK4) [18, 40, 80].

2. Zakażenia gammaherpeswirusami u osób z HIV/AIDS

EBV i HHV-8 są uznawane za patogeny, które w przypadku zaburzeń odporności wywołują choroby o poważnym przebiegu. Przy nieskutecznym leczeniu antyretrowirusowym lub przy jego braku zakażenie HIV upośledza odpowiedź immunologiczną, prowadząc w efekcie do rozwoju zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS) [89]. Zaburzenia w funkcjonowaniu układu immunologicznego sprzyjają reaktywacji latentnych gammaherpeswirusów, a także zaostrzają pierwotne infekcje wywołane przez EBV i HHV-8 [3].

Zakażenie EBV jest czynnikiem etiologicznym wielu typów chłoniaków u osób z HIV/AIDS, zarówno w obrębie układu limfatycznego, jak i ośrodkowego układu nerwowego [17]. Narastające w przebiegu HIV upośledzenie odporności oraz stała replikacja EBV mogą doprowadzić także do rozwoju leukoplakii włochatej [9]. Jest to stan uznawany za wskaźnikową chorobę w przebiegu AIDS, ale może także wystąpić u pacjentów poddanych immunosupresji. Leukoplakia włochata manifestuje się najczęściej obecnością charakterystycznych, białych, silnie przylegających zmian, zwykle na bocznych powierzchniach języka, błonie śluzowej policzków lub w obrębie dziąseł [3, 98].

Według klasyfikacji WHO HIV-zależne chłoniaki dzielimy następująco [11, 12]:

I. Chłoniaki występujące również u pacjentów immunokompetentnych
   1. chłoniak Burkitta
   2. chłoniak rozlany olbrzymiokomórkowy
      – centroblastyczny
      – immunoblastyczny
   3.3. pozawęzłowy chłoniak strefy brzeżnej MALT
   4.4. chłoniak węzłowy z limfocytów obwodowych
   5.5. chłoniak Hodgkina

II. Chłoniaki występujące swoiście u pacjentów HIV-dodatnich
   1. Pierwotny chłoniak wysiękowy
   2. chłoniak plasmablastyczny jamy ustnej

III. Chłoniaki występujące również w innych stanach upośledzenia odporności
   1. polimorficzny chłoniak z komórek B

2.1. Chłoniak Burkitta

Chłoniak Burkitta (BL – Burkitt's Lymphoma) jest od lat wiązany z zakażeniem EBV i występuje w trzech postaciach: endemicznej, sporadycznej oraz związanej z zakażeniem HIV. DNA EBV jest wykrywane w ponad 95% przypadków endemicznych BL i 15–30% sporadycznych BL. Wśród osób zakażonych HIV, u których rozwija się chłoniak Burkitta, obecność wirusa stwierdza się u 40–50% chorych [43]. Bez względu na miejsce występowania i związek z EBV, chłoniak Burkitta jest nieodmiennie związany ze swoistą translokacją chromosomalną długiego ramienia chromosomu 8 niosącego protoonkogen *c-myc* i jednego z *loci* ciężkiego lub lekkiego łańcucha immunoglobuliny na chromosomie 14 (ciężki łańcuch), 2 lub 22 (domeny κ lub λ łańcucha lekkiego). W konsekwencji powoduje to ciągłą ekspresję białka c-MYC, które stymuluje proces dojrzewania i proliferacji komórek oraz warunkuje przejście z fazy G_1 do S cyklu komórkowego [100]. Translokacja ta powoduje również, że transkrypcji ulega wyłącznie białko EBNA-1, które jest nieimmunogenne dla limfocytów T. Wciąż jednak pozostaje wiele nierozstrzygniętych kwestii dotyczących epidemiologii, etiologii i kofaktorów chłoniaka Burkitta nie związanego z zakażeniem EBV [6].

2.2. Inne chłoniaki związane z EBV

Poza chłoniakiem Burkitta, w przebiegu AIDS opisywane są też inne rodzaje chłoniaków związanych z zakażeniem EBV. Stanowią one zróżnicowaną grupę schorzeń, będącą następstwem obniżenia odporności związanej z zakażeniem HIV, czego bezpośrednim skutkiem jest niekontrolowana proliferacja limfocytów zawierających latentną formę EBV [16]. Związane z AIDS chłoniaki podzielone są na wiele podtypów, a EBV wykrywa się są u 30% do 90% wszystkich chorych [25]. Dodatkowo, ze względu na charakter zmian, wyróżnia się dwa typy chłoniaków występujących w przebiegu AIDS: immunoblastyczne i centroblastyczne, gdzie w pierwszym przypadku ekspresji ulegają białka LMP-1 i BCL-2, a drugim białko BCL-6, lecz nie LMP-1 czy BCL-2 [58]. Do najważniejszych odmian EBV-zależnych chłoniaków obserwowanych w przebiegu AIDS należą [5]:

– **chłoniaki nieziarnicze**, które aż w 95 % wywodzą się **z limfocytów B**. Najczęściej, bo u 90% pacjentów z AIDS spotyka się chłoniaka rozlanego olbrzymiokomórkowego (DLBCL – Diffuse Large B-cell Lymphoma) i chłoniaka Burkitta. Jest to typ chłoniaka ujawniony podczas epidemii HIV, związany z koinfekcją HIV i HHV-8 [56]. DLBCL u osób zakażonych HIV związany jest z zakażeniem EBV i zwykle przyjmuje typ immunoblastyczny. DLBCL i BL występują także u osób immunokompetentnych, jednak u osób HIV-dodatnich ryzyko lokalizacji DLBCL w obrębie OUN jest 3600 razy większe niż u osób, u których nie stwierdza się zakażenia HIV [23].
– **chłoniaki nieziarnicze z komórek T/NK**:
  • lokujące się w nosogardzieli (EBV wykrywa się w 90% przypadków)
  • angioimmunoblastyczne (związane z EBV w 0–51% przypadków),
  • rak żołądka o charakterze nabłoniaka limfatycznego (związany z EBV w około 90% przypadków)
  • gruczolakorak (5 do 25% przypadków ma podłoże EBV),
– rzadko obserwowane formy **chłoniaka wysiękowego** zawierającego zarówno EBV, jak i HHV-8, o różnej lokalizacji [24, 84].
– wywodzące się z limfocytów B **chłoniaki z ośrodków rozmnażania** (germinal center), lokujące się w ośrodkowym układzie nerwowym [16].

2.3. Mięsak Kaposiego

Mięsak Kaposiego to powstający wieloogniskowo nowotwór pochodzenia naczyniowego. W zależności od obrazu klinicznego i epidemiologii klasyfikowany jest do czterech postaci: klasycznej, endemicznej, jatrogennej (potransplacyjnej) oraz związanej z HIV/AIDS. Przełomowe znaczenie dla określenia etiologii mięsaka Kaposiego miała praca Chang i wsp. [20], którzy przy użyciu technik molekularnych jednoznacznie udowodnili że DNA HHV-8 występuje w bioptatach MK oraz potwierdzili onkogenny charakter wirusa. Obecnie uważa się, że cechą wspólną wszystkich postaci klinicznych mięsaka Kaposiego jest infekcja i aktywacja HHV-8 w zakażonych komórkach. Związek zakażenia KSHV z mięsakiem Kaposiego potwierdzają także wyniki badań serologicznych: przeciwciała przeciwko HHV-8 wykrywane są u 70–100% chorych, natomiast w ogólnej populacji zaledwie u 1–2% [67, 95]. Wykrycie mięsaka Kaposiego u nosiciela HIV przez lata uważane było za jeden z objawów wskaźnikowych AIDS. W grupie zakażonych HIV, mięsak Kaposiego dotyka zazwyczaj osób, które nabyły wirusa przez kontakt seksualny, natomiast dzieci zakażone drogą wertykalną, a także osoby, które zakaziły się poprzez przyjmowanie narkotyków drogą dożylną rzadko zapadają na tę chorobę [8, 90].

U chorych na MK wirusowe DNA zlokalizowane jest w mających cechy nowotworowe komórkach śródbłonka i komórkach wrzecionowatych [32, 101]. Należy jednak podkreślić, że sama obecność latentnej formy HHV-8 w komórkach jest niewystarczająca do rozwoju nowotworu, muszą zadziałać dodatkowe czynniki aktywujące, takie jak stan zapalny, obniżenie odporności wskutek zakażenia HIV lub leczenie immuno-

supresyjne związane z zabiegiem przeszczepienia [86]. Paradoksalnie zarówno wydzielanie mediatorów prozapalnych, jak i obniżenie odporności może skutkować reaktywacją HHV-8 ze stanu latencji. Reaktywowany herpeswirus pobudza wydzielanie interleukiny 6 oraz stymuluje angiogenezę, zarówno poprzez bezpośrednie oddziaływanie wirusowych homologów aktywatorów angiogenezy (białko K1, K15 oraz kaposyna B), jak i za pośrednictwem białek wirusowych stymulujących aktywatory gospodarza (białko vGPCR, vCCL, K8.1 i glikoproteina B), czego skutkiem jest właśnie rozwój mięsaka Kaposiego [10, 32, 66, 71, 91].

Stosowanie wysokoaktywnej terapii przeciwretrowirusowej (HAART – Highly Active Antiretroviral Therapy) prowadzi do ograniczenia zmian nowotworowych MK i spadku wiremii HHV-8. Może przebiegać to dwutorowo – z jednej strony stosowanie HAART poprawia funkcje układu odpornościowego i tym samym zwiększa kontrolę nad zakażeniem HHV-8, zaś z drugiej strony obniża również poziom wiremii HIV, czego efektem jest zmniejszenie poziomu proteiny Tat (transactivating protein), która prawdopodobnie ma właściwości naczyniotwórcze; może także chronić komórki mięsaka przed apoptozą [28, 31]. Ponadto, w zależności od zaawansowania zmian, możliwe jest leczenie miejscowe oraz radio- lub chemioterapia. W chemioterapii ogólnoustrojowej stosuje się przede wszystkim antracykliny [59]. W przypadku rozsianych zmian o lokalizacji poza płucnej w terapii mięsaka stosuje się winkrystynę lub winblastynę, niszczące komórki nowotworowe, a także podskórnie podawany interferon α, który działa antyproliferacyjnie, przeciwwirusowo i proapoptotycznie. Gdy zmiany nowotworowe obejmują skórę i narządy wewnętrzne, dobre efekty terapeutyczne osiąga się przy zastosowaniu liposomalnej daunorubicyny i doksorubicyny [44].

Kolejnym istotnym problemem związanym z zakażeniem HHV-8 u pacjentów HIV-dodatnich jest rozwój mięsaka Kaposiego w przebiegu zespołu rekonstrukcji immunologicznej (IRIS-KS – Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome-associated Kaposi's Sarcoma) [22]. Zespół ten jest stanem przejściowym, który pojawia się krótko po wdrożeniu HAART, szczególnie u pacjentów leczonych po raz pierwszy, z wyjściową wysoką wiremią HIV, niską liczbą limfocytów CD4+ oraz ciężkimi zakażeniami oportunistycznymi. Kryteria rozpoznania IRIS-KS obejmują nasiloną lub nietypową reakcję immunologiczną na istniejące zakażenia oportunistyczne, pojawienie się reakcji skórnych o charakterze nadwrażliwości typu późnego, powiększenie węzłów chłonnych oraz pojawienie się ziarniniaków lub ognisk martwicy [2]. Od 7 do 29% pacjentów z IRIS-KS, u których w trakcie zakażenia HIV pojawił się mięsak Kaposiego, cierpi z powodu jego rozrostu lub pojawienia się nowych ognisk nowotworu. Niebezpieczeństwo związane jest szczególnie z rozwojem trzewnej formy IRIS-KS, obarczonej wysokim wskaźnikiem śmiertelności [2, 7]. Kłopotliwy jest także mięsak zlokalizowany w okolicy szyjno-twarzowej, ponieważ jego skutkiem może być obrzęk błony śluzowej krtani i zaburzenia oddychania [22]. Nie ma obecnie jednoznacznie ustalonej terapii dotyczącej ciężkich postaci IRIS-KS; w praktyce leczenie obejmuje podawanie etopozydu, bleomycyny oraz pegylowanej liposomalnej formy doksorubicyny, a w uzasadnionych przypadkach także odroczenie terapii przeciwretrowirusowej [2, 26].

2.4. Wieloogniskowa choroba Castlemana

Wieloogniskowa choroba Castlemana jest odczynowym rozrostem limfocytów B i/lub plazmocytów w węzłach chłonnych i zaliczana jest do łagodnych chorób limfoproliferacyjnych. Występuje w dwóch postaciach: zlokalizowanej, zazwyczaj u młodszych osób oraz wieloogniskowej (rozsianej) u pacjentów w podeszłym wieku i o znacznie gorszym rokowaniu [92]. Dotychczas brak jest danych sugerujących możliwość transformacji postaci zlokalizowanej w wieloośrodkową. Zmiany dotyczą najczęściej węzłów chłonnych śródpiersia i płuc oraz węzłów chłonnych szyjnych i pachowych, rzadziej o innej lokalizacji. Zazwyczaj MCD obserwuje się u chorych z AIDS, rzadko u poddanych immunosupresji pacjentów HIV-seroujemnych [75, 92]. Leczenie postaci zlokalizowanej polega na chirurgicznym usunięciu guza. W terapii wieloogniskowej choroby Castlemana brak jest konkretnych wytycznych; stosuje się głównie przeciwciała monoklonalne anty-IL-6 i kortykosteroidy [26, 73].

Nie jest jasne, czy występuje bezpośredni związek między MCD a opisanym niedawno u pacjentów HIV-dodatnich zakażonych HHV-8 zespołem cytokinowo-zapalnym związanym z KSHV (KICS – KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome). W przebiegu choroby Castlemana obserwuje się nasiloną i niekontrolowaną odpowiedź zapalną, wyrażającą się w nadmiernej syntezie IL-6. Stwierdzono, że reakcja zapalna tego typu może występować także w postaci izolowanej KICS [77], i podobnie jak w MCD, jest wynikiem nadmiernej reakcji autokrynowej na ekspresję endogennej IL-6, jak również jej wirusowego homologu (vIL-6), jednak bez towarzyszących zmian patologicznych charakteryzujących chorobę Castlemana [77].

2.5. Pierwotny chłoniak wysiękowy jam surowiczych

Pierwotny chłoniak wysiękowy jam surowiczych jest rzadką, agresywną odmianą chłoniaka B-komórkowego, rozwijającą się w jamach surowiczych opłucnej, otrzewnej, a czasem w osierdziu. Typowy jest dla niego

pierwotny wysięk, przy braku obecności guza [57]. PEL należy do bardzo złośliwych nowotworów, bowiem czas przeżycia chorych od momentu postawienia diagnozy waha się od 1 do 14 miesięcy. Ponadto, w prawie 50% przypadków, u pacjentów z PEL rozwija się także mięsak Kaposiego. Choroba ta występuje u około 5% pacjentów z AIDS i jest nowym typem chłoniaka, ujawnionym podczas epidemii HIV w latach 80-tych XX w. i zawsze związanym z zakażeniem HHV-8. W 7–80% przypadkach chłoniaka w komórkach wykrywany jest również EBV prezentujący I typ latencji [15, 56].

3. Zakażenia gammaherpeswirusami u osób poddanych immunosupresji

3.1. Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna

Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna (PTLD – Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder) jest heterogenną grupą chorób, charakteryzującą się niekontrolowaną proliferacją komórek układu chłonnego, najczęściej limfocytów B (90%), rzadziej limfocytów T (9%) lub komórek NK (0,5%) [52]. Najistotniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju PTLD jest rozwój zakażenia EBV po transplantacji, co może wynikać zarówno z reaktywacji wirusa latentnego, jak i z zakażenia pierwotnego. Ryzyko rozwoju PTLD wzrasta gdy biorca przeszczepu jest EBV-seroujemny, i oceniane jest na 23% do 50%, podczas gdy u biorców EBV-serododatnich wynosi od 0,7% do 1,9% [50]. Przyczyną rozwoju PTLD jest transformacja blastyczna komórek zakażonych EBV przy współistniejącym upośledzeniu funkcji limfocytów T, wynikającym z immunosupresji. Powoduje to zahamowanie eliminacji zakażonych komórek przez limfocyty T-cytotoksyczne, naruszenie stanu równowagi poprzez zmniejszenie liczby swoistych dla EBV komórek CD8+ prowadzące do niekontrolowanego namnażania EBV, czego skutkiem jest zakażenie i transformacja kolejnych limfocytów B. Ze względu na różnice występujące w przebiegu i w obrazie klinicznym wyróżnia się wczesną i późną postać PTLD [52]. W ujawniającej się przed upływem roku od włączenia immunosupresji wczesnej postaci PTLD znacznie częściej stwierdza się związek z zakażeniem EBV.

Ryzyko zależy również od rodzaju przeszczepianego narządu: w przypadku przeszczepienia komórek krwiotwórczych wynosi ono około 1%, nerki – 2%, serca – 5%, płuca – od 5 do 10%, wątroby – od 5 do 15%, i do 20% w przypadku przeszczepienia jelita cienkiego [21, 29]. Choroba rozwija się zazwyczaj w przeciągu pierwszych 6 miesięcy po zabiegu przeszczepienia. Leczenie PTLD jest trudne i polega głównie na zmniejszeniu dawki leków immunosupresyjnych, co może się przyczynić do odrzucenia przeszczepionego narządu. Z tego powodu sugerowane też jest zamienianie typowo stosowanych leków immunosupresyjnych na inhibitory mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin), takich jak sirolimus lub ewerolimus [72]. Niektóre ośrodki wykonujące zabiegi przeszczepiania narządów unaczynionych, stosując się do wytycznych stosowanych w transplantacjach komórek krwiotwórczych, wprowadzają terapię wyprzedzającą z użyciem rytuksymabu (przeciwciało monoklonalne anty-CD20) [72]. Nie ma jednak wystarczających danych, aby przyjąć tę strategię jako zalecenie w przeszczepieniach narządów unaczynionych, a przeprowadzone dotychczas obserwacje nie potwierdziły skuteczności rytuksymabu w leczeniu rozpoznanej klinicznie PTLD; bardziej celowe wydaje się jego stosowanie w profilaktyce tego schorzenia [49, 82, 93].

3.2. Limfohistiocytoza hemofagocytarna

Limfohistiocytoza hemofagocytarna (HLH – Hemophagocytic Lymphohistiocytosis) jest potencjalnie śmiertelnym stanem hiper zapalenia, spowodowanym silną, lecz nieefektywną odpowiedzią immunologiczną, która może być wywoływana przez czynniki wrodzone (pierwotne HLH) lub nabyte, takie jak reakcje autoimmunologiczne, nowotwory czy zakażenia [48, 63]. Wśród czynników zakaźnych mogących skutkować rozwinięciem HLH jednym z najpowszechniejszych jest wirus Epsteina-Barr [78]. Fizjologicznie, podczas infekcji wirusowej w wyniku stymulacji limfocytów Th_1 dochodzi do pobudzenia komórek NK i limfocytów Tc, które dokonują eliminacji czynnika wywołującego odpowiedź immunologiczną, co skutkuje jego ograniczeniem. Jednak w przypadku braku stosownej odpowiedzi ze strony limfocytów Tc i komórek NK, limfocyty Th_1 z pomocą makrofagów (w tym także makrofagów tkankowych – histiocytów) wydzielają coraz wyższe stężenia cytokin, by tę odpowiedź wywołać. Efektem powyższego jest stan „burzy cytokinowej", będącej niekontrolowanym procesem zapalnym, którego ograniczenie jest dla organizmu niemożliwe i prowadzi do niewydolności wielonarządowej [48]. Taki stan, bez właściwego leczenia, skutkuje zgonem. Śmiertelność nawet w leczonej HLH indukowanej przez infekcję EBV jest wysoka i waha się między 18 a 24% [55, 63, 78].

Do rozpoznania nabytej HLH potrzebne jest wystąpienie u pacjenta co najmniej 5 z 8 następujących objawów: wysoka gorączka, splenomegalia, cytopenia w co najmniej dwóch liniach komórkowych, hiperferrytynemia, hipertrójglicerydemia lub hipofibrynogenemia, wzrost stężenia CD25, zmniejszona aktywność komórek NK, hemofagocytoza w śledzionie, szpiku kostnym lub węzłach chłonnych [63, 64].

W HLH kluczowe dla rokowań pacjenta jest szybkie postawienie właściwej diagnozy i wdrożenie lecze-

nia. W przypadku HLH indukowanego przez wirusa Epsteina-Barr, infekcję wirusową kontrolować można za pomocą rytuksymabu podawanego dożylnie, a odpowiedź immunologiczną usiłuje się wyciszyć za pomocą kortykosterydów, takich jak deksametazon oraz cytostatyków w rodzaju etopozydu [64, 78].

3.3. Chłoniak Hodgkina

Ziarnica złośliwa (choroba Hodgkina, HD – Hodgkin Disease) to grupa limfoidalnych chorób nowotworowych, morfologicznie wyróżniająca się występowaniem charakterystycznych olbrzymich komórek, nazywanych komórkami Reed-Stenberga (komórkami RS) [102]. Geneza chłoniaka Hodgkina nie jest w pełni wyjaśniona. Hipermutacje w genach immunoglobulin oraz stwierdzony w komórkach RS typ II latencji EBV wskazują, że HD może wywodzić się z limfocytów B z ośrodków rozmnażania. Jednak znane są rzadkie odmiany chłoniaka wywodzące się z limfocytów T [37].

W obecnej klasyfikacji wyróżnia się pięć postaci HD [4, 13, 37]:

1. chłoniak guzkowy Hodgkina z przewagą limfocytów (nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma) – około 5% wszystkich przypadków HD, w komórkach nowotworu nie stwierdza się materiału genetycznego EBV;
2. ziarnica typu NS (nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma) to około 65–75% przypadków HD, w tej odmianie rzadko stwierdza się wcześniejsze zakażenie EBV;
3. ziarnica typu MC (mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma) to około 20–25% HD; w ponad 70% komórek RS wykrywa się genom EBV;
4. ziarnica typu LD (lymphocyte depleted classical Hodgkin lymphoma) stanowi mniej niż 5% przypadków ziarnicy złośliwej, często wiąże się z zakażeniem EBV;
5. klasyczna ziarnica bogata w limfocyty (lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease) to dość rzadka postać ziarnicy, w około 40% stwierdza się zakażenie EBV

Szczyt zachorowań na ziarnicę przypada na dwa przedziały wiekowe: wczesne dzieciństwo i okres po ukończeniu 60 roku życia. Ryzyko rozwoju nowotworu u osób starszych jest trzykrotnie wyższe, jeśli w młodości przeszli oni mononukleozę zakaźną [4]. Wydaje się, że wystąpienie ziarnicy złośliwej u osób po 60 roku życia wiąże się z osłabieniem reakcji immunologicznej wynikającym z zaawansowanego wieku, z tego powodu sam chłoniak Hodgkina częściej dotyka osób starszych [45, 53]. Chłoniak Hodgkina związany z EBV występować może u biorców przeszczepów (szczególnie narządów unaczynionych), u osób HIV-dodatnich, jak i u osób immunokompetentnych.

Standardowe leczenie chłoniaka Hodgkina nie zależy od tego, czy jest on związany z EBV, czy też nie. Postępowanie terapeutyczne określa się na podstawie wyników badań histologicznych, stopnia zaawansowania choroby oraz oceny prognostycznej. Za złoty standard uznaje się leczenie przy użyciu doksorubicyny, bleomycyny, winblastyny i dakarbazyny (ABVD), wspomagane w razie konieczności radioterapią obszarów pierwotnie zajętych [72]. Eksperymentalne leczenie HD związanego z EBV obejmuje terapię adoptywną z zastosowaniem cytotoksycznych limfocytów T aktywowanych EBV, jednak wiąże się ona z dość wysokim ryzykiem wywołania choroby przeszczep-przeciwko-gospodarzowi [37].

3.4. Zakażenia KSHV

U biorców przeszczepów, u których nie stwierdza się zakażenia HIV, choroby o podłożu KSHV obserwowane są rzadko, jednak ich ryzyko ich wystąpienia jest około 200 razy większe niż w populacji ogólnej [41]. Dotyczy to przede wszystkim mięsaka Kaposiego, dla którego podstawowym kofaktorem wydaje się być podawanie leków immunosupresyjnych. Pozostałe schorzenia wywoływane przez KSHV, takie jak chłoniaki plazmablastyczne o podłożu KSHV (w tym PEL), choroba Castlemana oraz zespół cytokinowo-zapalny, obserwowane są w tej grupie pacjentów skrajnie rzadko [26, 54, 61, 69].

4. Zakażenia gammaherpeswirusami we wrodzonych zespołach niedoborów odporności

Choroba Duncana, czyli występujący u chłopców zespół limfoproliferacyjny związany z chromosomem X (XLP – X-linked Lymphoproliferative syndrome), charakteryzuje się niezwykle ciężkim przebiegiem zakażenia pierwotnego EBV. W jego przebiegu, antygeny oraz DNA EBV wykrywa się w węzłach chłonnych, śledzionie, grasicy i innych narządach wewnętrznych [79]. Schorzenie to charakteryzuje się patologiczną reakcją na pierwotne zakażenie EBV i masywną poliklonalną proliferacją limfocytów B, T oraz makrofagów, co skutkuje rozwojem następujących postaci choroby: (i) mononukleozy zakaźnej o bardzo ciężkim przebiegu, z reguły z towarzyszącym nadostrym zapaleniem wątroby i rozwojem zespołu hematofagocytozy (HLH, patrz wyżej); (ii) skrajnie obniżonym poziomem syntezy gammaglobulin (dysgammaglobulinemią); oraz (iii) rozwojem złośliwych chłoniaków. Przebieg zakażenia EBV jest różny nawet w przypadku bliźniąt z XLP, a trzy wymienione postaci choroby mogą tworzyć praktycznie dowolne kombinacje kliniczne [103]. Genetyczne podłoże XLP związane jest z mutacjami

w genie *SLAM* (Signalling Lymphocytic Activation Molecule), określanym też jako *SH2D1A* [94]. Zlokalizowany w Xq25 gen *SH2D1A* koduje białko SAP, które jest ważnym mediatorem uczestniczącym w transdukcji sygnału między komórkami NK i limfocytami T [87], jednak dokładny mechanizm zależności między zaburzeniem komunikacji NK-T, a rozwojem ciężkich postaci zakażenia EBV nie jest znany. Podstawą oceny prenatalnego ryzyka wystąpienia XLP u dziecka są badania genetyczne rodziców i rodzeństwa, zwłaszcza w przypadku rodzinnej historii XLP. Monitorowanie rozwoju zakażenia EBV u dziecka z rozpoznanym nieprawidłowym genotypem *SH2D1A* obejmuje monitorowanie DNA EBV w próbkach krwi obwodowej, ocenę markerów HLH oraz monitorowanie poziomu immunoglobulin [35]. Śmiertelność w przebiegu zakażenia pierwotnego EBV u pacjentów z XLP uzależniona jest od konkretnej postaci schorzenia i wynosi od 9% (chłoniaki) do 66% (HLH). Leczenie XLP jest w praktyce bardzo podobne do leczenia stosowanego odpowiednio w zespole hematofagocytozy, przewlekłej agammaglobulinemii lub w chłoniakach o podłożu EBV [103].

Dwa kolejne zespoły dziedziczne, usposabiające do występowania ciężkich postaci zakażeń EBV, związane są z obniżoną aktywnością cytotoksyczną komórek NK oraz zmniejszoną liczbą, a nawet brakiem, limfocytów NKT. Pierwszy z nich, czyli związany z chromosomem X rodzinny wariant HLH (X-linked familial HLH), traktowany jest przez niektórych autorów jako odmiana XLP [103]. Wiele jednak przemawia za tym, że jest to odrębny zespół, którego podłożem są mutacje w genie inhibitora apoptozy związanego z chromosomem X (*XIAP*, Xq25), nie zaś w genie *SH2D1A* [65]. Zespół ten charakteryzuje się wysokim ryzykiem wystąpienia HLH, przy niewielkim prawdopodobieństwie rozwoju zmian limfoproliferacyjnych. Drugi z nich, to zespół limfoproliferacyjny związany z EBV, którego podłożem genetycznym są mutacje w genie indukowanej przez interleukinę 2 kinazy limfocytów T (*ITK*). Przebieg zakażenia EBV u pacjentów z *ITK*-zależną chorobą limfoproliferacyjną jest ciężki, towarzyszy mu masywna wiremia, a skutkiem jest intensywny rozwój chłoniaków, w tym ziarnicy złośliwej [38]. Leczenie polega przede wszystkim na przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, natomiast w odróżnieniu od PTLD, stosowanie monoklonalnych przeciwciał anty-CD20 (rytuksymabu) skutkuje tylko przejściową poprawą stanu klinicznego [38].

Opisany niedawno zespół XMEN (X-linked immunodeficiency, Magnesium defect, EBV infection and Neoplasia) spowodowany jest mutacjami w genie MAGT1 (Xq21.1). Produkt tego genu odgrywa podstawową rolę w utrzymaniu prawidłowego wewnątrzkomórkowego stężenia Mg^{2+}, co wskazuje pośrednio na znaczenie homeostazy jonów magnezu w reakcjach odpornościowych [60]. Zaburzenie równowagi magnezowej prowadzi do nieprawidłowej ekspresji receptora aktywującego komórki NK (NKG2D), zarówno na powierzchni samych NK, jak i limfocytów T CD8+, co skutkuje obniżeniem ich aktywności cytotoksycznej wobec komórek zakażonych EBV. Od strony klinicznej, przebieg zakażenia pierwotnego EBV w zespole XMEN przypomina przewlekłe aktywne zakażenie EBV (CAEBV – chronic active EBV), przy czym, w odróżnieniu od CAEBV, obarczone jest wysokim ryzykiem wystąpienia zmian limfoproliferacyjnych [60]. W zespole XMEN obserwuje się także ogólne upośledzenie odporności, czego skutkiem są towarzyszące narządowe i ogólnoustrojowe wirusowe zakażenia oportunistyczne. Leczenie ma charakter eksperymentalny i obejmuje podawanie rytuksymabu, aktywowanych przeciw EBV limfocytów T od dawcy spokrewnionego oraz wysokich dawek magnezu. Rozważana jest także możliwość przeszczepiania komórek krwiotwórczych, jednak dotychczasowe wyniki takiego leczenia nie są zachęcające ze względu na wysoką śmiertelność biorców [81]. Podstawą monitorowania przebiegu choroby jest ocena ilościowa DNA EBV we krwi, natomiast badania serologiczne są w praktyce nieprzydatne. Z diagnostycznego punktu widzenia pomocna jest ocena ekspresji genu MAGT1, a także badanie poziomu receptora NKG2D we krwi pełnej [19].

W odróżnieniu od EBV, jak do tej pory nie stwierdzono związku między konkretnym dziedzicznym zespołem upośledzenia odporności a zwiększoną zapadalnością lub swoistą formą przebiegu zakażenia HHV-8.

5. Podsumowanie

Gammaherpeswirusy stanowią wciąż poważne zagrożenie dla pacjentów z upośledzeniem odporności. U ludzi immunokompetentnych zakażenia wirusami z tej podrodziny przebiegają często bezobjawowo lub z łagodną manifestacją kliniczną. Niedobory immunologiczne powodują jednak zaburzenia w kontroli procesu replikacji EBV i HHV-8, wpływając na inicjację onkogenezy wirusowej i prowadząc do rozwoju chorób limfoproliferacyjnych. EBV i HHV-8 stanowią także poważne zagrożenie dla pacjentów zakażonych HIV. Część chorób wywoływanych przez te patogeny jest tak ściśle związana z obniżeniem odporności, że mogą być uznawane za choroby wskaźnikowe pojawiające się w przebiegu AIDS. Z powodu poważnych konsekwencji zakażeń gammaherpeswirusami u pacjentów z niedoborami odporności konieczne jest monitorowanie replikacji wirusów i ewentualna wczesna interwencja, w postaci obniżenia dawek leków immunosupresyjnych i/lub wdrożenia stosownego leczenia przeciwnowotworowego, przeciwzapalnego i immunomodulującego.

Piśmiennictwo

1. Ablashi D.V., Chatlynne L.G., Whitman J.E. Jr, Cesarman E.: Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin. Microbiol. Rev*. **15**, 439–464 (2002)
2. Achenbach C.J., Harrington R.D., Dhanireddy S., Crane H.M., Casper C., Kitahata M.M.: Paradoxical immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patients treated with combination antiretroviral therapy after AIDS-defining opportunistic infection. *Clin. Infect. Dis*. **54**, 424–433 (2012)
3. Adamczyk K., Byczkowska K., Kowalska-Piaskowska A., Mozer-Lisewska I.: Zakażenia wywołane przez wirusy z rodziny Herpesviridae u osób HIV dodatnich. *Now. Lek.* **79**, 474–478 (2010)
4. Andersson J.: Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma. *Herpes*, **13**, 12–16 (2006)
5. Aozasa K., Zaki MA.: Epidemiology and pathogenesis of nasal NK/T-cell lymphoma: a mini-review. *ScientificWorld Journal*. **11**, 422–428 (2011)
6. Bornkamm GW.: Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int. J. Cancer*. **124**, 1745–1755 (2009)
7. Bower M., Nelson M., Young A.M., Thirlwell C., Newsom-Davis T., Mandalia S., Dhillon T., Holmes P., Gazzard B.G., Stebbing J.: Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5224–5228 (2005)
8. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H., Burgdorf W. (red.). Dermatology. Wyd. 2. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2000, s. 1486–1488
9. Braz-Silva P.H., de Rezende N.P., Ortega K.L., de Macedo Santos R.T., de Magalhães M.H.: Detection of the Epstein-Barr virus (EBV) by in situ hybridization as definitive diagnosis of hairy leukoplakia. *Head Neck Pathol.* **2**, 19–24 (2008)
10. Brinkmann M.M., Pietrek M., Dittrich-Breiholz O., Kracht M., Schulz T.F.: Modulation of host gene expression by the K15 protein of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* **81**, 42–58 (2007)
11. Campo E., Swerdlow S.H., Harris N.L., Pileri S., Stein H., Jaffe E.S.. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, **117**, 5019–5032 (2011)
12. Carbone A., Gloghini A.: AIDS-related lymphomas: from pathogenesis to pathology. *Br. J. Haematol*. **130**, 662–670 (2005)
13. Carbone A., Gloghini A., Caruso A., De Paoli P., Dolcetti R.: The impact of EBV and HIV infection on the microenvironmental niche underlying Hodgkin lymphoma pathogenesis. *Int. J. Cancer*. **140**, 1233–1245 (2017)
14. Cattani P., Cerimele F., Porta D., Graffeo R., Ranno S., Marchetti S., Ricci R., Capodicasa N., Fuga L., Amico R., Cherchi G., Gazzilli M., Zanetti S., Fadda G.: Age-specific seroprevalence of human herpesvirus 8 in Mediterranean regions. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**, 274–279 (2003)
15. Cesarman E., Chang Y., Moore P.S., Said J.W., Knowles DM.: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N. Engl. J. Med*. **332**, 1186–1191 (1995)
16. Cesarman E., Mesri E.A.: Virus-associated lymphomas. *Curr. Opin. Oncol.* **11**, 322–332 (1999)
17. Cesarman E.: Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett*. **305**, 163–174 (2011)
18. Cesarman E.: Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders. *Annu. Rev. Pathol*. **9**, 349–372 (2014)
19. Chaigne-Delalande B., Lenardo M.J. i wsp: Mg2+ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. *Science*, **341**, 186–191 (2013)
20. Chang Y., Cesarman E., Pessin M.S., Lee F., Culpepper J., Knowles DM., Moore P.S.: Identification of herpesvirus-like DNA sequence in AIDS-associated KS. *Science*, **266**, 1865–1869 (1994)
21. Clavies A., Tiemann M., Wagner H-J., Dreger P., Suttorp M.: Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease after bone marrow transplantation mimicking graft-versus-host disease. *Pediatr. Transplant*. **4**, 151–155 (2000)
22. Connick E., Kane M.A., White I.E., Ryder J., Campbell T.B.: Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi sarcoma during potent antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis*. **39**, 1852–1855 (2004)
23. Cote TR, Manns A, Hardy CR i wsp.: Epidemiology of brain lymphoma among people with or without acquired immunodeficiency syndrome. AIDS/Cancer Study Group. *J. Natl. Cancer Inst*. **88**, 675–679 (1996)
24. Crane G.M., Ambinder R.F., Shirley C.M., Fishman E.K., Kasamon Y.L., Taube J.M., Borowitz M.J., Duffield A.S.: HHV-8-positive and EBV-positive intravascular lymphoma: an unusual presentation of extracavitary primary effusion lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol*. **38**, 426–432 (2014)
25. Davi F., Raphaël M. i wsp.: Burkitt-like lymphomas in AIDS patients: Characterization within a series of 103 human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphomas. Burkitt's Lymphoma Study Group. *J. Clin. Oncol.* **16**, 3788–3795 (1998)
26. De Paoli P., Carbone A.: Kaposi's Sarcoma Herpesvirus: twenty years after its discovery. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. **20**, 1288–1294 (2016)
27. Dow D.E., Cunningham C.K., Buchanan A.M.: A Review of human herpesvirus 8, the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, in the pediatric population. *J. Pediatric. Infect. Dis. Soc*. **3**, 66–76 (2014)
28. Dupin N., Escande J.P. i wsp.: The influence of highly active antiretroviral therapy on AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Br. J. Dermatol.* **140**, 875–881 (1999)
29. Durandy A., Sutton L., Bordigoni P., Garnier J., Bidois J., Deist F., Blanche S., Fischer A.: Anti-B-cell monoclonal antibody treatment of severe posttransplant B-lymphoproliferative disorder: prognostic factors and long-term outcome. *Blood*, **92**, 3137–3147 (1998)
30. Ebell M.H.: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Am. Fam. Physician*. **70**, 1279–1287 (2004)
31. Ensoli B., Barillari G., Salahuddin S.Z.: Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature,* **345**, 84–86 (1990)
32. Emuss V., Lagos D., Pizzey A., Gratrix F., Henderson S.R., Boshoff C.: KSHV manipulates notch signaling by DLL4 and JAG1 to alter cell cycle genes in lymphatic endothelia. *PLoS Pathog*. **5**, e100016 (2009)
33. Epstein M.A., Barr Y.M., Achong B.G.: A second virus-carrying tissue culture strain (EB2) of lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Pathol. Biol*. **12**, 1233–1234 (1964)
34. Epstein M.A., Henle G., Achong B.G., Barr Y.M.: Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J. Exp. Med.* **121**, 761–770 (1965)
35. Filipovich A.H., Zhang K., Snow A.L., Marsh R.A.: X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood,* **116**, 3398–3408 (2010)
36. Fujii T., Taguchi H., Katano H., Mori S., Nakamura T., Nojiri N., Nakajima K., Tadokoro K., Juji T., Iwamoto A.: Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. *J. Med. Virol.* **57**, 159–162 (1999)
37. Geng L., Wang X.: Epstein-Barr Virus-associated lymphoproliferative disorders: experimental and clinical developments. *Int. J. Clin. Exp. Med*. **8**,14656–14671 (2015)

38. Ghosh S., Bienemann K., Boztug K., Borkhardt A.: Interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK) deficiency – clinical and molecular aspects. *J. Clin. Immunol.* **34**, 892–899 (2014)
39. Görzer I., Niesters H.G., Cornelissen J.J., Puchhammer-Stöckl E.: Characterization of Epstein-Barr virus Type I variants based on linked polymorphism among EBNA3A, -3B, and -3C genes. *Virus Res.* **118**, 105–114 (2006)
40. Gramolelli S., Schulz TF.: The role of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in the pathogenesis of Kaposi sarcoma. *J. Pathol.* **235**, 368–380 (2015)
41. Grulich A.E., Vajdic C.M.: The epidemiology of cancers in human immunodeficiency virus infection and after organ transplantation. *Semin. Oncol.* **42**, 247–257 (2015)
42. Hardie DR.: Human gamma-herpesviruses: a review of 2 divergent paths to oncogenesis. *Transfus. Apher. Sci.* **42**, 177–183 (2014)
43. zur Hausen H.: Epstein-Barr virus. (w) Infections Causing Human Cancer. Wiley-VCH Verlag, Weinhem, 2006, s. 65–95
44. Hengge U., Ruzicka T., Tyring S.K., Stuschke M., Roggendorf M., Schwartz R.A., Seeber S.: Update on Kaposi's sarcoma and other HHV-8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations and therapy. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 281–292 (2002)
45. Henke-Gendo C., Viejo-Borbolla A., Schulz T.F.: Kaposi's sarkoma-associated herpesvirus (Human herpesvirus 8) (w) Principles and practice of clinical virology, red. A.J. Zuckerman, J.E. Banatvala, B.D. Schoub, P.D. Griffiths, P. Mortimer, Willey-Blackwell, Oxford, 2009, s. 245–261
46. Heslop HE.: How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood*, **114,** 4002–4008 (2009)
47. Hladik W., Pellett P.E., Hancock J., Downing R., Gao H., Packel L., Mimbe D., Nzaro E., Mermin J.: Association between transfusion with human herpesvirus 8 antibody-positive blood and subsequent mortality. *J. Infect. Dis*. **1206**, 1497–1503 (2012)
48. Jędrzejczak W.W.: Limfohistiocytoza hemofagocytarna – rzadko rozpoznawany uleczalny stan bezpośredniego zagrożenia życia występujący również u dorosłych. *Acta Haematol. Pol*. **38**, 515–526 (2008)
49. Kalinova L., Indrakova J., Bachleda P.: Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub*. **153**, 251–257 (2009)
50. Karst J., Konopka L.: Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna. *Onkol. Pol*. **8**, 209–216 (2005)
51. Kieff E., Rickinson A.B.: Epstein-Barr virus and its replication. (w) Fields Virology, wyd. 4, red. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, s. 2511–2575
52. Kim H.J., Huh J. i in.: Hematopathology Study Group of the Korean Society of Pathologists. Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders: Review and Update on 2016 WHO Classification. *J. Pathol. Transl. Med*. **51**, 352–358 (2017)
53. Klein G.: Perspectives in studies of human tumor viruses. *Front. Biosci.* **7**, 268–274 (2002)
54. Klepfish A., Zuckermann B., Schattner A.: Primary effusion lymphoma in the absence of HIV infection – clinical presentation and management. *QJM*. **108**, 481–488 (2015)
55. Kleynberg R.L., Schiller G.J.: Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: an update on diagnosis and therapy. *Clin. Adv. Hematol. Oncol*. **10**, 726–732 (2012)
56. Knowles D.M., Inghirami G., Ubriaco A., Dalla-Favera R.: Molecular genetic analysis of three AIDS-associated neoplasms of uncertain lineage demonstrates their B-cell derivation and the possible pathogenetic role of the Epstein-Barr virus. *Blood*. **73**, 792–799 (1989)
57. Kotlarek-Haus S., Haus O.: Chłoniaki u osób zakażonych HIV. *Acta. Haematol. Pol*. **31**, 249–258 (2000)
58. Larocca L.M., Gaidano G., i wsp.: The molecular and phenotypic profile of primary central nervous system lymphoma identifies distinct categories of the disease and is consistent with histogenetic derivation from germinal center-related B cells. *Blood*. **92**, 1011–1019 (1998)
59. Levine A.M., Tulpule A.: Clinical aspects and management of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Cancer*. **37**, 1288–1295 (2001)
60. Li F.Y., Chaigne-Delalande B., Kanellopoulou C., Davis J.C., Matthews H.F., Douek D.C., Cohen J.I., Uzel G., Su H.C., Lenardo M.J.: Second messenger role for Mg2+ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature,* **475**, 471–476 (2011)
61. Liu M., Liu B., Liu B., Wang Q., Ding L., Xia C., Dong L.: Human immunodeficiency virus-negative plasmablastic lymphoma: a comprehensive analysis of 114 cases. *Oncol. Rep.* **33**, 1615–1620 (2015)
62. Luppi M., Barozzi P., Schulz T.F., Setti G., Staskus K., Trovato R., Narni F., Donelli A., Maiorana A., Marasca R., Sandrini S., Torelli G.: Bone marrow failure associated with human herpesvirus 8 infection after transplantation. *N. Engl. J. Med*. **343**, 1378–1385 (2000)
63. Machaczka M.: Limfohistiocytoza hemofagocytarna – współczesny problem medyczny. *Pol. Merk. Lek*. **187**, 59–63 (2012)
64. Machowicz R., Drozd-Sokołowska J., Zduńczyk D., Górnicka B., Boguradzki P., Jędrzejczak W.: Limfohistiocytoza hemofagocytarna (HLH) indukowana przez chłoniaka – opis przypadku. *OncoReview,* **1**, 304–307 (2011)
65. Marsh R.A., Madden L., Kitchen B.J., Mody R., McClimon B., Jordan M.B., Bleesing J.J., Zhang K., Filipovich A.H.: XIAP deficiency: a unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease. *Blood,* **116**, 1079–1082 (2010)
66. Martin D., Galisteo R., Molinolo A.A., Wetzker R., Hirsch E., Gutkind J.S.: PI3Kgamma mediates kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vGPCR-induced sarcomagenesis. *Cancer Cell,* **19**, 805–813 (2011)
67. Mckee P.H., Calonje E., Granter S.R.: Pathology of the skin with clinical correlations. Elsevier Mosby, London, 2006, s. 1830–1836.
68. Minhas V., Wood C.: Epidemiology and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Viruses*. **6**, 4178–94 (2014)
69. Mularoni A., Conaldi P.G. i wsp.: Successful Treatment of Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Inflammatory Cytokine Syndrome After Kidney-Liver Transplant: Correlations with the Human Herpesvirus 8 miRNome and Specific T Cell Response. *Am. J. Transplant.* doi: 10.1111/ajt.14346 (2017)
70. Münz C., Moormann A.: Immune escape by Epstein-Barr virus associated malignancies. *Semin. Cancer. Biol.* **18**, 381–387 (2008)
71. Mutlu A.D., Mesri E.A. i wsp.: In vivo-restricted and reversible malignancy induced by human herpesvirus-8 KSHV: A cell and animal model of virally induced kaposi's sarcoma. *Cancer Cell,* **11**, 245–258 (2007)
72. Neparidze N., Lacy J.: Malignancies associated with Epstein-Barr virus: pathobiology, clinical features, and evolving treatments. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **12**, 358–371 (2014)
73. Newlon J.L., Couch M., Brennan J.: Castleman's disease: three case reports and a review of the literature. *Ear Nose Throat J*. **86**, 414–418 (2007)
74. Oksenhendler E., Cazals-Hatem D., Schulz T.F., Barateau V., Grollet L., Sheldon J., Clauvel J.P., Sigaux F., Agbalika F.: Transient angiolymphoid hyperplasia and Kaposi's sarcoma after primary infection with human herpesvirus 8 in a patient with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1585–1590 (1998)

75. Palac-Siczek M., Pierniczka-Załęska M., Borowska K.: Ograniczona choroba Castlemana o łagodnym przebiegu klinicznym – opis przypadku. *Otolaryngol. Pol.* **65**, 108–111 (2011)
76. Pierangeli A., Antonelli G., Gentile G.: Immunodeficiency-associated viral oncogenesis. *Clin Microbiol Infect*. **21**, 975–983 (2015)
77. Polizzotto M.N., Uldrick T.S., Hu D., Yarchoan R.: Clinical manifestations of Kaposi sarcoma herpesvirus lytic activation: Multicentric Castleman Disease (KSHV-MCD) and the KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome. *Front. Microbiol*. **3**, 73 (2012)
78. Przybylski M., Dzieciatkowski T., Zduńczyk D., Jędrzejczak W.W., Luczak M.: Microbiological findings and treatment of EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **58**, 247–252 (2010)
79. Purtilo D.T., Cassel C.K., Yang J.P.S., Harper L.: X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet.* **1**, 935–940 (1975)
80. Purushothaman P., Dabral P., Gupta N., Sarkar R., Verma S.C.: KSHV genome replication and maintenance. *Front. Microbiol.* **7**, 54 (2016)
81. Ravell J., Chaigne-Delalande B., Lenardo M.: X-linked immunodeficiency with magnesium defect, Epstein-Barr virus infection, and neoplasia disease: a combined immune deficiency with magnesium defect. *Curr. Opin. Pediatr*. **26**, 713–719 (2014)
82. Reddy N., Rezvani K., Barrett A.J., Savani BN.: Strategies to prevent EBV reactivation and posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after allogeneic stem cell transplantation in high-risk patients. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **17**, 591–597 (2011)
83. Lieberman P., Hu J., Renne R.: Gammaherpesvirus maintenance and replication during latency (w) Human Herpesviruses, Biology, Therapy and Immunoprophylaxis, red. Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K., Cambridge University Press, Cambridge, 2007, s. 379–403
84. Ruiz-Cordero R.R., Lewis J., Blieden C., Campuzano-Zuluaga G., Hernandez J., Lossos I.S., Ikpatt F., Chapman J.R., Vega F.: Unusual immunophenotypic variant of large B-cell lymphoma associated with HHV-8 and EBV in an HIV positive patient. *Human Pathol.: Case Reports.* **2**, 49–54 (2015)
85. Sarmati L.: HHV-8 infection in African children. *Herpes*, **11**, 2–8 (2004)
86. Schulz T.: The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J. Path.* **208**, 187–198 (2006)
87. Schwartzberg P.L., Mueller K.L., Qi H., Cannons J.L.: SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat. Rev. Immunol*., **9**, 39–46 (2009)
88. Shu C.H., Chang Y.S., Liang C.L., Liu S.T., Lin C.Z., Chang P.: Distribution of type A and type B EBV in normal individuals and patients with head and neck carcinomas in Taiwan. *J. Virol. Methods.* **38**, 123–130 (1992)
89. da Silva S.R., de Oliveira D.E.: HIV, EBV and KSHV: viral cooperation in the pathogenesis of human malignancies. *Cancer Lett.* **305**, 175–185 (2011)
90. Simon K., Knysz B., Szybejko-Machaj G., Gładysz A: Mięsak Kaposiego u pacjentów z nabytym zespołem upośledzenia odporności (AIDS) — obserwacje własne. *Współcz. Onkol.* **1**, 21–24 (2000)
91. Sodhi A., Montaner S., Patel V., Gomez-Roman J.J., Li Y., Sausville E.A., Sawai E.T., Gutkind J.S.: AKT plays a central role in sarcomagenesis induced by kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded g protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4821–4826 (2004)
92. Soumerai J.D., Sohani A.R., Abramson J.S.: Diagnosis and management of Castleman disease. *Cancer Control*. **21**, 266–278 (2014)
93. Stojanova J., Caillard S., Rousseau A., Marquet P.: Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): Pharmacological, virological and other determinants. *Pharmacol. Res.* **63**, 1–7 (2011)
94. Sumazaki R., Kanegane H., Osaki M., Fukushima T., Tsuchida M., Matsukura H., Shinozaki K., Kimura H., Matsui A., Miyawaki T.: SH2D1A mutations in Japanese males with severe Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Blood*, **98**, 1268–1270 (2001)
95. Tappero J.W., Conant M.A., Wolf S.F., Berger T.G.: Kaposi's sarcoma. Epidemiology, pathogenesis, histology, clinical spectrum, staging criteria and therapy. *J. Am. Acad. Dermatol*. **28**, 371–395 (1993)
96. Thompson MP., Kurzrock R.: Epstein-Barr virus and cancer. *Clin. Cancer Res*. **10**, 803–821 (2004)
97. Thorley-Lawson D.A., Gross A.: Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med*. **350**, 1328–1337 (2004)
98. Tserenpuntsag B., Kołacińska A., Jabłonowska E.: Nowotwory związane z AIDS w erze skojarzonego leczenia antyretrowirusowego (HAART). *Przegl. Epidemiol.* **61**, 529–534 (2007)
99. Uldrick T.S., Whitby D.: Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. *Cancer Lett*. **305**, 150–162 (2011)
100. Vereide D., Sugden B.: Proof for EBV's sustaining role in Burkitt's lymphomas. *Semin. Cancer Biol*. **19**, 389–393 (2009)
101. Viejo-Borbolla A., Schulz T.F.: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV8): key aspects of epidemiology and pathogenesis. *AIDS Rev*. **5**, 222–229 (2003)
102. Weiss L.M., Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. *Curr. Oncol. Rep*. **2**, 199–204 (2000)
103. Zhang K., Wakefield E., Marsh R.: Lymphoproliferative Disease, X-Linked. 27.02.2004 [aktualizacja 30.06.2016]. (w) Pagon R.A., Adam M.P., Ardinger H.H. i in. (red.): *Gene Reviews®* [Internet], University of Washington, Seattle, (1993–2016)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 156–166
http://www.pm.microbiology.pl

ZWIERZĘTA GOSPODARSKIE I TOWARZYSZĄCE JAKO REZERWUAR ZOONOTYCZNYCH SZCZEPÓW ROTAWIRUSA

Iwona Kozyra, Artur Rzeżutka*

Zakład Wirusologii Żywności i Środowiska, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Wpłynęło w listopadzie 2017 r., zaakceptowano w lutym 2018 r.

Streszczenie: Zakażenia rotawirusami (RV) są istotnym problemem epidemiologicznym zarówno u ludzi jak i u wielu gatunków zwierząt gospodarskich. Dotychczas zidentyfikowano szereg szczepów RV człowieka i zwierząt, które na podstawie właściwości antygenowych białka VP6 kapsydu zaklasyfikowano do 8 serogrup (A-H). Za najważniejszą epidemiologicznie grupę serologiczną uważa się rotawirusy grupy A (RVA) wykrywane w ponad 90% przypadków biegunek rotawirusowych. Segmentowa budowa genomu RVA oraz obecność zwierząt w bliskim otoczeniu człowieka sprzyja reasortacji pomiędzy szczepami wirusa pochodzącymi od różnych gospodarzy, prowadzącej do pojawienia się szczepów zoonotycznych. Narastająca liczba przypadków zakażeń człowieka wywołana przez RVA o genotypach, które dotychczas wyłącznie stwierdzano u zwierząt wskazuje na potrzebę prowadzenia nadzoru epidemiologicznego w ogniskach zachorowań ludzi połączonego z identyfikacją epidemicznych szczepów wirusa. Określenie genotypów RVA krążących u ludzi i zwierząt umożliwi ocenę wpływu szczepień na zmienność i selekcję szczepów wirusa, a także na pojawianie się szczepów zoonotycznych.

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka i klasyfikacja rotawirusów. 3. Zakażenia rotawirusami grupy A u ludzi. 4. Zakażenia rotawirusami grupy A u zwierząt. 5. Zmienność i reasortacja rotawirusów jako procesy warunkujące powstawanie szczepów zoonotycznych. 6. Wpływ szczepień człowieka na zmienność profilu genotypowego krążących szczepów rotawirusa. 7. Podsumowanie

Farmed and companion animals as reservoirs of zoonotic rotavirus strains

Abstract: Rotavirus (RV) infections are a major epidemiological problem in humans and farm animals. So far, a number of human and animal RV strains have been identified. Based on the antigenic properties of the VP6 capsid protein, they have been classified into eight serogroups (A-H). The most important of them are viruses from group A (RVA), which are responsible for more than 90% of cases of rotaviral diarrhoea. The segmented structure of the virus genome and the presence of animals in human neighbourhood favour genetic reassortment between RV strains originating from different hosts. This could result in an emergence of zoonotic virus strains. The increasing number of human infections caused by virus strains having genotypes which have only been identified in animals indicates the need for epidemiological surveillance of infections. Additionally, the identification of epidemic virus strains in the outbreaks of disease in humans should be conducted. The identification of RVA strains circulating in humans and animals will allow the assessment of the impact of vaccination on the selection and emergence of zoonotic RVA strains.

1. Introduction. 2. General characteristics and classification of rotaviruses. 3. Group A rotavirus infection in humans. 4. Group A rotavirus infection in animals. 5. Genetic changes and reassortment as factors leading to the formation of zoonotic rotavirus strains. 6. Impact of human immunization on changes in genotype profile of circulating rotavirus strains. 7. Conclusions

Słowa kluczowe: rotawirus grupy A, szczepy zoonotyczne, transmisja, zwierzęta
Key words: animals, rotavirus group A, zoonotic transmission, zoonotic strains

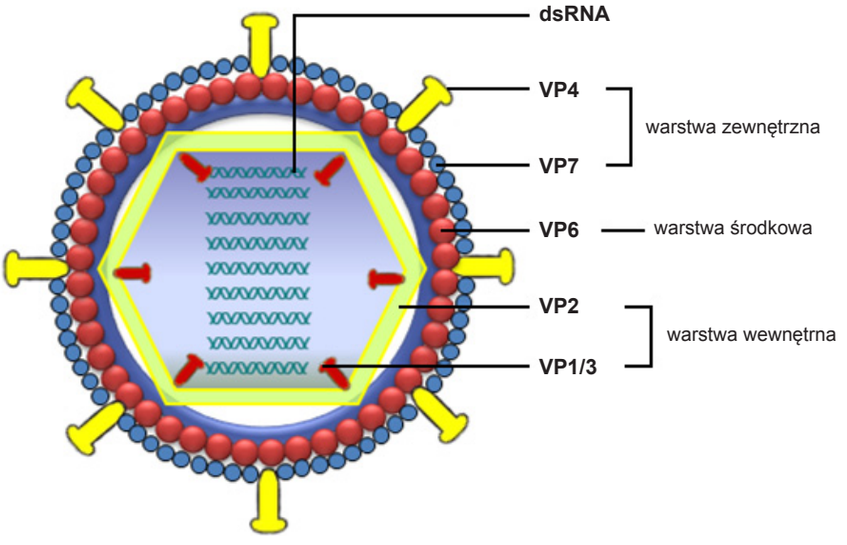
1. Wstęp

Rotawirusy (RV) są szeroko rozpowszechnione u człowieka i wielu gatunków zwierząt wywołując, szczególnie u młodych osobników, ostre infekcje przewodu pokarmowego, którym towarzyszą biegunki o różnym stopniu nasilenia. Ich obecność stwierdzano, m.in. u zwierząt gospodarskich (świnie, małe i duże przeżuwacze, konie, króliki i drób grzebiący), towarzyszących (psy, koty), a także u dziko żyjących ssaków (naczelne, przeżuwacze, niedźwiedziowate, nietoperze, gryzonie) i ptaków [10, 29, 35, 43, 61, 65, 67, 89].

Na podstawie właściwości antygenowych białka VP6 kapsydu wirusa, RV podzielono na osiem grup serologicznych od A do H [15, 52]. RV grupy A, B, C i H występują u ludzi i zwierząt, natomiast wirusy grup D-G stwierdzane są wyłącznie u zwierząt [20]. RV grupy E izolowano jedynie od świń [73], natomiast grupy D, F i G od ptaków [47, 61]. Badania metagenomowe wskazują na obecność kolejnych grup serologicznych wirusa oznaczonych jako I i J, które obejmują szczepy wirusa wykrywane odpowiednio u psów i nietoperzy [5, 55]. Rotawirusy grupy A (RVA) uważa się za najważniejszą epidemiologicznie grupę serologiczną. Są one odpowiedzialne za 90% zakażeń rotawirusowych zwierząt i ludzi, natomiast RV z grup B, C, E i H identyfikuje się sporadycznie [44, 90].

Infekcje RVA stanowią istotny czynnik strat ekonomicznych w hodowli zwierząt gospodarskich ze względu na zmniejszenie przyrostu masy ciała zwierząt,

* Autor korespondencyjny: Dr hab. Artur Rzeżutka prof. nadzw., Zakład Wirusologii Żywności i Środowiska, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; tel. 81 889 30 36; e-mail: arzez@piwet.pulawy.pl



Rys. 1. Schemat budowy RV
Na rycinie zaznaczono miejsca lokalizacji poszczególnych białek w wirionie, zaadaptowany z Angel i wsp., 2007 [2].

spadek nieśności lub liczby odchowanego potomstwa, jak również wysokich kosztów leczenia [21, 47, 64, 94]. Są one również ważnym problemem epidemiologicznym u ludzi, gdyż uważa się je za najczęstszy czynnik etiologiczny ostrych biegunek u dzieci do 5 roku życia [6, 69]. Szacuje się, że rocznie na świecie dochodzi do ponad 140 milionów zachorowań na tle rotawirusowym, z czego 450 000 zakażeń to przypadki śmiertelne u dzieci [69]. W Europie biegunki rotawirusowe notuje się u około 3,6 mln dzieci z 231 przypadkami śmiertelnymi [81]. Ponadto RVA stanowią główną przyczynę zakażeń szpitalnych, co znacznie zwiększa koszty leczenia oraz wydłuża czas hospitalizacji [22, 39]. Ocenia się, że straty ekonomiczne w Stanach Zjednoczonych będące wynikiem zakażenia RVA u ludzi sięgają jednego miliarda dolarów rocznie, natomiast w Europie wynoszą ok. 1,5 miliarda euro [26]. Przypadki biegunek u ludzi o etiologii rotawirusowej są ewidencjonowane w kraju przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny. Od 2005 roku obserwuje się stały wzrost zachorowań z 33 944 przypadkami infekcji odnotowanymi w 2015 roku [59].

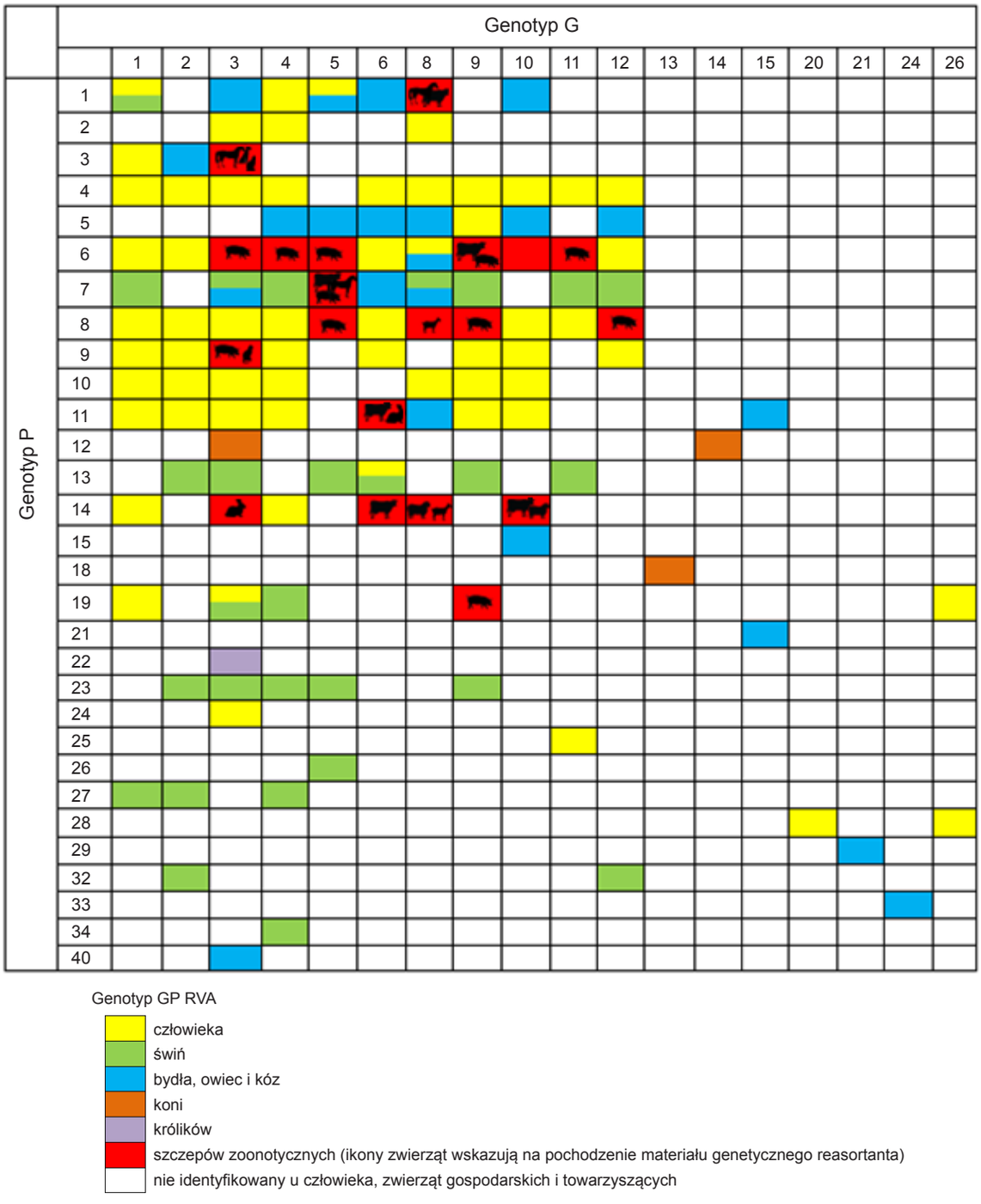
Obecnie coraz częściej u ludzi stwierdzane są zakażenia wywołane przez szczepy RVA pochodzące od zwierząt jak i będące reasortantami RV zwierząt i człowieka [34, 56]. Badania epidemiologiczne przeprowadzone na terenie Europy wskazały, że ok. 2% szczepów wirusa zidentyfikowanych u osób chorych to reasortanty RVA zwierząt i człowieka [34]. Również analizy sekwencji nukleotydowych segmentów genomu kodujących białka kapsydu VP7 i VP4 RVA wykrywanych w Europie u świń, bydła i zwierząt towarzyszących wskazały na ich filogenetyczne pokrewieństwo do RVA człowieka [54, 63, 67].

2. Ogólna charakterystyka i klasyfikacja rotawirusów

Po raz pierwszy RV zostały wykryte w 1963 roku w komórkach nabłonka jelit myszy [1]. W 1973 roku zespół prof. Ruth Bischop z Australii stwierdził obecność wirusa u dzieci z objawami biegunki [68]. W tym samym czasie inna grupa badaczy pod kierownictwem dr Lindy Saif zidentyfikowała RV u prosiąt [78]. Możliwość rutynowej diagnostyki zakażeń RVA pojawiła się cztery lata później, kiedy zastosowano metodę ELISA do wykrywania antygenu rotawirusowego w próbkach kału zwierząt [98]. Również adaptacja RV do linii ciągłej komórek nerki małpy (MA 104) umożliwiła dalszy rozwój metod badawczych, które oprócz diagnostyki znalazły zastosowanie w badaniach epidemiologicznych [24, 80]. RV należą do jedynej grupy wirusów w rodzinie *Reoviridae*, które wywołują infekcje przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. Ich nazwa (łac. *rota* = koło) wynika z morfologii cząstek wirusa widzianych w obrazie mikroskopu elektronowego [23]. Są to bezotoczkowe wirusy, których genom składa się z 11 segmentów dwuniciowego RNA [20, 68]. Poszczególne segmenty genomu kodują informacje dotyczące białek strukturalnych (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 i VP7) oraz w zależności od szczepu od 5 do 6 białek niestrukturalnych [68] (rys. 1).

Z punktu epidemiologicznego najistotniejszymi białkami wirusa są białka zewnętrznej warstwy kapsydu VP7 i VP4, które również odgrywają istotną rolę w procesie zakażenia, indukują odpowiedź immunologiczną i stanowią podstawę klasyfikacji RVA na genotypy G (VP7) i P (VP4) [51]. Dotychczas zidentyfikowano 27 genotypów G oraz 38 genotypów P RVA u ludzi i zwierząt [6, 51] (tab. I).

Tabela I
Genotypy szczepów RVA wykrytych u człowieka i zwierząt



Badania nad zmiennością genetyczną RVA potwierdziły, że segmentowa budowa genomu wirusa odgrywa kluczową rolę w procesie reasortacji prowadzącym do tworzenia nowych szczepów, w tym szczepów o charakterze zoonotycznym zdolnych do pokonania bariery międzygatunkowej. Do identyfikacji RVA, a także do oceny tempa ich ewolucji jak i oceny pokrewieństwa pomiędzy szczepami zwierząt i ludzi w 2008 roku Grupa Robocza WHO ds. Klasyfikacji Rotawirusów (RCWG – Rotavirus Classification Working Group) opracowała nowy system klasyfikacji szczepów RVA, oparty na analizie sekwencji nukleotydowych wszystkich 11 segmentów genomu wirusa. Każdemu segmentowi genomowego RNA kodującemu poszczególne białka wirusa przypisano określony genotyp przyjmując następującą formułę: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx odpowiednio dla białek VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6. Symbol „x” w zapi-

sie genotypu odpowiada liczbom arabskim zaczynającym się od 1, które oznaczają kolejny wariant danego genotypu np. G1, G2, G3 [51].

3. Zakażenia rotawirusami grupy A u ludzi

Do zakażenia RVA głównie dochodzi drogą fekalno-oralną w wyniku kontaktu z osobą chorą lub siewcą wirusa. Sporadycznie odnotowywano przypadki zapalenia żołądka i jelit po spożyciu zanieczyszczonej wirusami wody lub żywności [75, 92]. Oprócz kału, u zakażonych osób wirusa stwierdzano w moczu, wydzielinie górnych dróg oddechowych, surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym [33, 99]. Przebieg infekcji rotawirusowej uzależniony jest od wieku i kondycji układu immunologicznego zakażonych osób. Największą zachorowalność odnotowuje się u dzieci pomiędzy 6 a 36 miesiącem życia. Natomiast u niemowląt do 6 m-ca życia i osób dorosłych zakażenia RVA stwierdzane są sporadycznie i mają one najczęściej przebieg łagodny lub bezobjawowy [41]. W przypadku osób z obniżoną odpornością obserwuje się cięższy przebieg choroby i dłuższe utrzymywanie się objawów klinicznych [12]. Infekcje częściej stwierdza się wśród chłopców niż dziewczynek [68]. W krajach o umiarkowanym klimacie zakażenia RVA występują sezonowo ze wzrostem liczby zachorowań w okresie jesienno-zimowym, natomiast w rejonach tropikalnych biegunki rotawirusowe obserwuje się z tym samym nasileniem przez cały rok [41, 44, 68]. W przebiegu zakażenia głównym objawem jest biegunka o różnym stopniu nasilenia, której towarzyszą wymioty i gorączka. Wystąpienie ostrej biegunki, zwłaszcza u noworodków może doprowadzić do skrajnego odwodnienia, zaburzeń elektrolitowych ze wstrząsem oligowolemicznym i śmierci [41]. U dzieci, szczególnie z obniżoną odpornością, notowano przypadki pozajelitowych infekcji rotawirusowych, które dotyczyły górnych dróg oddechowych oraz układu nerwowego [33, 99].

Za zachorowania ludzi na świecie głównie odpowiedzialne są RVA o genotypach: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8], przy czym szczepy wirusa o genotypie G1 wywołują ok. 60–96% zakażeń [6, 51]. Inne genotypy ważne z epidemiologicznego punktu widzenia to G12 i P[6] [4, 6]. Pozostałe genotypy P i G nie odgrywają istotnej roli w epidemiologii zakażeń rotawirusowych u ludzi, a ich rozprzestrzenienie w populacji nie przekracza 1%. Wywołują one infekcje sporadycznie i przeważnie występują endemicznie czego dowodem są lokalne epidemie [6, 40]. Ponadto obserwuje się geograficzne zróżnicowanie w występowaniu poszczególnych genotypów RVA człowieka. Również w Europie, Azji i Afryce dominuje genotyp G1, w przeciwieństwie do Ameryki Płn. i Australii gdzie głównie notuje się G2 RVA. Natomiast występowanie szczepów G3, G4, G9 i G12 RVA uznaje się za endemiczne dla poszczególnych kontynentów. Analizując dane dotyczące obecności genotypu P[4], P[6] i P[8] RVA człowieka nie obserwuje się różnic w ich geograficznym rozprzestrzenieniu [6, 77, 96].

4. Zakażenia rotawirusami grupy A u zwierząt

U zwierząt podobnie jak u ludzi objawy kliniczne i przebieg zakażenia uzależniony jest od wieku i statusu immunologicznego zwierząt, zjadliwości wirusa, współistniejących zakażeń, sposobu żywienia oraz warunków chowu [36, 94]. U większości gatunków zwierząt infekcjom jedynie wywołanym przez RVA towarzyszy słabo nasilona biegunka [65, 74], natomiast zakażenia bakteryjne zwłaszcza enterotoksycznymi szczepami *Escherichia coli* zaostrzają przebieg choroby. Obserwuje się wówczas intensywną biegunkę z szybko postępującym odwodnieniem, co skutkuje zwiększonym odsetkiem padnięć [60, 64, 65, 74]. Wśród zwierząt, najwięcej zakażeń RVA rozpoznaje się w stadach świń, szczególnie u prosiąt do 8 tygodnia życia [8, 94]. Oprócz biegunki u chorych zwierząt obserwuje się osłabienie łaknienia, depresję oraz spadek masy ciała. W przypadku zwierząt starszych zakażenie najczęściej przebiega bezobjawowo, a osobniki te stanowią stały rezerwuar wirusa w środowisku fermy. Szczepy RVA dotychczas stwierdzone u świń należą do 51 genotypów GP, które powstały w wyniku wzajemnej reasortacji [64]. Dominującymi genotypami spośród wykrywanych szczepów RVA świń są G3, G4, G5, G9 i G11 w połączeniu z P[6] lub P[7]. Pozostałe genotypy G i P identyfikuje się sporadycznie, a ich rozpowszechnienie nie przekracza 6% [64] (tab. I). W przypadku zakażeń RVA u trzody chlewnej obserwuje się geograficzne zróżnicowanie występowania poszczególnych genotypów [64]. Co ciekawe szczepy o genotypach G i P typowych dla RVA świń wywołują również zachorowania u innych gatunków zwierząt gospodarskich, towarzyszących, dziko żyjących jak i u ludzi.

Zakażenia RVA są również uważane za główną przyczynę wirusowych biegunek u dużych i małych przeżuwaczy [64, 65]. Najbardziej podatne na zakażenie są najmłodsze zwierzęta do 4 tygodnia życia. U cieląt, jagniąt i koźląt biegunkom rotawirusowym często towarzyszą zakażenia bakteryjne głównie wywoływane przez *E. coli*. Po przechorowaniu zakażenia obserwuje się siewstwo wirusa, które sprzyja cyklicznemu pojawianiu się biegunek w stadach zwierząt [36, 65]. Skutecznym sposobem ograniczenia rozprzestrzeniania się zakażeń RVA w stadach bydła i związanych z tym strat w hodowli jest stosowanie szczepień ochronnych [64]. Zachorowania przeżuwaczy wywołują szczepy RVA

należące do co najmniej 13 genotypów G i P (tab. I) [64, 65]. U bydła dominują szczepy G6, G8, G10 RVA, w połączeniu z P[1], P[5], P[11]. Natomiast u jagniąt i koźląt najczęściej stwierdzanym genotypem P RVA jest P[14] i P[15] [65]. P[14] jest również jednym z dwóch genotypów P RVA wywołującym zakażenia u królików [10, 49]. Ponadto dotychczas zidentyfikowane królicze szczepy RVA należą wyłącznie do genotypu G3.

RVA są jedną z zakaźnych przyczyn biegunek i padnięć źrebiąt [48, 66]. Zakażenia u koni są szeroko rozpowszechnione o czym świadczy obecność przeciwciał anty-RVA u większości badanych zwierząt [72]. W ponad 99% przypadków zachorowań wykrywano szczepy G3P[12] i G14P[12], natomiast szczepy o pozostałych genotypach G (G5, G8, G10, G13) i P (P[1], P[3], P[7], P[18]) nie odgrywają istotnej roli w epidemiologii zakażeń RVA u tego gatunku zwierząt [66]. Uważa się, że ich obecność u koni to efekt międzygatunkowej transmisji wirusa [48, 66].

U drobiu zakażenia RVA stanowią przyczynę zaburzeń trawienia i wchłaniania paszy, które określane są jako syndrom zahamowania wzrostu (RSS – Runting Stunting Syndrom) lub syndrom złego wchłaniania (MAS – Malabsorption Syndrom) [47, 61]. Obecność wirusa w stadach kurcząt i indyków w Europie wynosi od 11% do 85% [47]. U ptaków identyfikowano szczepy o genotypach G7, G23, G22 i P[37]. Stanowią one genetycznie odrębną grupę szczepów wirusa w porównaniu do RVA ssaków [61].

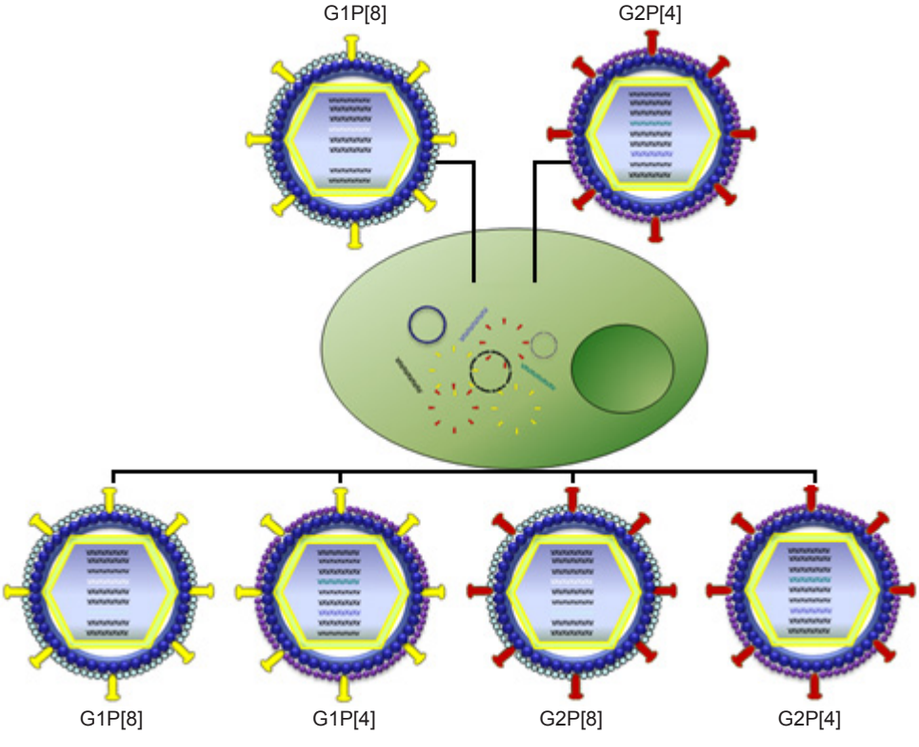
Przebieg zakażeń RVA u zwierząt towarzyszących jak psy i koty jest na ogół bezobjawowy [67]. Jedynym genotypem G RVA dotychczas stwierdzonym u psów i kotów podobnie jak u królików jest G3 [25, 67].

5. Zmienność i reasortacja rotawirusów jako procesy warunkujące powstawanie szczepów zoonotycznych

Budowa genomowego RNA RV predysponuje do wystąpienia zjawiska reasortacji, które polega na wymianie segmentów genomu pomiędzy odmiennymi cząstkami wirusa (rys. 2).

Proces ten ma miejsce w komórce gospodarza zakażonej przez dwa różne szczepy RVA. Obecność zwierząt w bliskim otoczeniu człowieka sprzyja reasortacji pomiędzy szczepami RVA zwierząt i człowieka prowadzącej do powstania odmiennych antygenowo szczepów wirusa, w tym szczepów zoonotycznych [3, 11, 44, 70]. Istnienie tego zjawiska potwierdzają wyniki analizy filogenetycznej genów kodujących białka niestrukturalne oraz białka kapsydu zoonotycznych szczepów wirusa wykrywanych u ludzi [57].

Obecność reasortantów RVA, które pokonały barierę międzygatunkową i wywołały zakażenie człowieka stwierdzano już w latach 80. ubiegłego wieku, kiedy po raz pierwszy zachorowania mieszkańców Ameryki Łacińskiej wywołał szczep o nietypowym dla człowieka



Rys. 2. Schemat procesu reasortacji RVA
Schemat zaadaptowany z pracy Dennehy, 2008 [15].

genotypie G5 [88]. Jego genom zawierał odcinki RNA pochodzące od szczepów wirusa dotychczas wykrywanych u świń [27, 79]. W tym samym czasie u chorych osób w Azji, również wykryto nowy genotyp G9P[19] RVA. Przeprowadzona analiza molekularna wykazała, że co najmniej dziewięć segmentów genomu wirusa w tym gen kodujący białko VP4 pochodzą od RVA świń [3, 19, 44, 54]. Obecnie, notuje się narastającą liczbę przypadków zakażeń ludzi reasortantami RVA świń i człowieka o genotypach: G1-G5P [6], G5P[8], G9P[6], G9P[19], G11P[6], G12[6] i G12P[8] [3, 17, 42, 44, 57, 63, 83, 85, 93]. Najczęściej wykrywanym u człowieka zoonotycznym szczepem RVA świń jest G4P[6], który był w stanie rozprzestrzenić się w populacji ludzi [14, 17, 45, 62, 63, 83, 93, 99]. Porównanie sekwencji nukleotydowych genów kodujących białka strukturalne i niestrukturalne szczepów RVA o tym genotypie izolowanych od osób chorych pochodzących z różnych rejonów świata z sekwencjami RVA świń wskazało na ich ścisłe pokrewieństwo filogenetyczne. Istniało ono w obrębie genów kodujących wszystkie białka wirusa z wyjątkiem niestrukturalnego NSP1 [14, 17, 63]. Kolejnym dowodem wskazującym, że świnie mogą stanowić źródło zakaźnych dla człowieka RV są przypadki zachorowań dzieci wywołane przez szczepy G9P[6] i G9P[19] RVA [97, 100]. Analiza filogenetyczna w obu przypadkach wykazała 100% pokrewieństwo całego genomu szczepów stwierdzonych u dzieci do RVA świń. Związek ewolucyjny pomiędzy G9 RVA świń i człowieka potwierdziły też badania innych autorów, którzy dowiedli, że krążące u ludzi rotawirusy o tym genotypie to najprawdopodobniej zaadoptowane do organizmu człowieka szczepy RVA świń [30, 84]. RVA świń wykazują również zdolność bezpośredniej transmisji na człowieka [18, 38, 42, 56]. Przykładem jest zoonotyczny szczep G5P[6] RVA świń wykrywany u ludzi w Azji [18, 42] i Japonii [38]. Natomiast w Europie odnotowano tylko jeden przypadek infekcji człowieka wywołanej przez RVA świń o tym genotypie [56]. Wyniki badań wskazują, że zoonotyczne szczepy RVA, których źródłem były świnie częściej posiadały genotyp P[6] niż inne genotypy P typowe dla tego gatunku zwierząt [31, 86]. Zdolność do przekraczania bariery międzygatunkowej przez szczepy P[6] RVA najprawdopodobniej wynika z budowy białka VP4 odgrywającego kluczową rolę w przebiegu zakażenia. Zawiera ono lektynę (hemaglutynina), która wiąże się nie tylko z kwasem sjalowym będącym głównym receptorem w komórkach nabłonka jelit, ale i z innymi receptorami o podobnej budowie obecnymi na powierzchni komórek w drogach oddechowych i moczowo-płciowych [31, 76]. Wiązanie P[6] RVA z wieloma receptorami ułatwia zakażenie nowego gospodarza, co może tłumaczyć częstsze przypadki infekcji ludzi wywołane przez szczepy RVA świń o tym genotypie. Niemniej jednak w przypadku szczepów G5P[6] RVA brak pełnej zgodności pomiędzy determinantami antygenowymi RVA świń i receptorami w komórkach człowieka nie pozwala na szybkie rozprzestrzenianie się zwierzęcych szczepów wirusa u ludzi [56, 86]. Podobnie pozostałe zoonotyczne szczepy RVA świń jak: G1-G3P[6], G3P[9], G5P[8], G11P[6], G12[6] i G12P[8] stwierdzane były u ludzi sporadycznie i nie odgrywały one istotnej roli w epidemiologii zakażeń rotawirusowych u człowieka.

Odzwierzęcą transmisję na człowieka zaobserwowano również w przypadku RVA przeżuwaczy. Zoonotyczne szczepy RVA bydła należą głównie do genotypów G6, G8, G10 i P[14] [4, 53, 58], chociaż sporadycznie infekcje u ludzi powodowały szczepy RVA bydła o genotypach P[1], P[8], P[9], P[10] i P[11]. Pierwsze przypadki biegunek u ludzi wywołanych przez G8 RVA bydła stwierdzono w latach 80. ubiegłego wieku w Azji [28]. Następnie reasortanty G8P[4], G8P[6] i G8P[8] RVA bydła i człowieka pojawiły się u ludzi w Afryce, a od 2006 r. wykrywano je na terenie Europy [58]. We wszystkich przypadkach badania genomowe potwierdziły ścisłe pokrewieństwo pomiędzy szczepami G8 RVA niezależnie od tego czy wykrywano je u ludzi czy też u zwierząt. Przekroczenie bariery międzygatunkowej (zwierzę/człowiek) zaobserwowano również w przypadku bydlęcego szczepu G10P[11] [32, 37]. Niemniej jednak w ostatnich latach odnotowano wzrost infekcji rotawirusowych u ludzi spowodowanych przez zoonotyczne szczepy G6P[14], G8P[14] i G10P[14] RVA pochodzące od przeżuwaczy [4, 7, 13, 46, 50, 53, 82, 95]. Genom zoonotycznego szczepu G8P[14] RVA, który odpowiedzialny był za zachorowania dzieci we Włoszech posiadał 10 spośród 11 segmentów RNA charakteryzujących się 100% pokrewieństwem do szczepów wirusa o tym genotypie, które wykrywano u owiec [53]. Kolejny przypadek hospitalizacji dziecka z objawami ciężkiego zapalenia żołądka i jelit stwierdzono w Belgii, w którym źródłem chorobotwórczych P[14] RVA mogły być króliki [49]. Zakażenia ludzi wywołane przez typowy dla królików szczep G3P[14] odnotowano również w Chinach, Australii i we Włoszech [10, 16]. Analizy molekularne szczepów P[14] RVA zwierząt i człowieka wykazały, że mają one wspólne pochodzenie i można je uznać za bydlęce lub królicze reasortanty wirusa.

Szczepy G3P[3] i G3P[9] RVA o typowych genotypach RVA dla psów i kotów stwierdzono również u ludzi. We wszystkich przypadkach osoby chore były opiekunami lub miały bezpośredni kontakt z zakażonymi zwierzętami. Szczep G3P[3] RVA człowieka charakteryzował się wyższym pokrewieństwem do szczepów RVA psa o tym genotypie niż do szczepów człowieka [67]. Również wysoką przekraczającą 90% zgodność sekwencji nukleotydowych genomu wykazano pomiędzy szczepami G3P[9] RVA człowieka i kota

[25]. Przedstawione wyniki badań dowodzą, że RVA krążące w populacji zwierząt towarzyszących można uznać za potencjalnie zoonotyczne.

6. Wpływ szczepień człowieka na zmienność profilu genotypowego krążących szczepów rotawirusa

Swoistą immunoprofilaktykę zakażeń rotawirusowych mającą na celu zmniejszenie liczby przypadków śmiertelnych wśród dzieci rozpoczęto w 2004 r., wraz z wprowadzeniem do stosowania szczepionki Rotarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals) w Meksyku i na Dominikanie. W 2006 r. amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) zatwierdziła do rutynowej immunizacji dzieci szczepionkę RotaTeq™ (Merck Sharp & Dohme Corp USA) [9]. W kolejnych latach obie szczepionki zostały dopuszczone do stosowania w ponad 100 krajach na całym świecie, a w 60 z nich, w tym również i w Polsce przynajmniej jedną wprowadzono do krajowych programów immunoprofilaktycznych [91]. Rotarix™ to preparat monowalentny zawierający szczep RVA człowieka o genotypie G1P[8] natomiast RotaTeq™ jest rekombinowaną pentawalentną szczepionką opracowaną na bazie reasortantów RVA bydła i człowieka o genotypach G1, G2, G3, G4 i P[8]. Oba preparaty zostały ocenione jako wysoce immunogenne i bezpieczne [91]. Skuteczność szczepień oraz ich wpływ na pojawianie się nowych genotypów G, P wirusa w poszczególnych regionach świata jest monitorowana od momentu przeprowadzenia pierwszych szczepień profilaktycznych dzieci [6, 40, 91]. Porównując skalę zachorowań wywołanych przez RVA u dzieci i ich przebieg w okresie przed i po wprowadzeniu szczepień, zaobserwowano istotny, sięgający nawet 90% spadek liczby hospitalizacji i przypadków śmiertelnych wśród dzieci z powodu biegunek rotawirusowych [6]. Zarówno szczepionka monowalenta Rotarix™ jak i pentawalentna RotaTeq™ wykazują podobną skuteczność przeciwko zakażeniom wywoływanym przez homotypowe (RVA o tych samych genotypach co szczepy szczepionkowe) i heterotypowe szczepy wirusa posiadające odmienne genotypy [40]. Niemniej jednak, w krajach stosujących szczepionkę monowalentną obserwowano wzrost zachorowań ludzi wywołanych przez heterotypowy szczep G2P[4] RVA. Pojawienie się tego szczepu nie wynika z podawania szczepionki, a ze zmienności RVA [6, 40]. Podobnie pojawienie się nowych, zoonotycznych szczepów G6P[14], G8P[14] G9P[8], G10P[14] G12P[6] i G12P[8] RVA w szczepionych populacjach uważa się, że jest efektem naturalnej zmienności i selekcji bardziej zjadliwych szczepów RVA [34, 40]. W niektórych przypadkach nowo pojawiające się szczepy wirusa mogą mieć niekorzystny wpływ na sytuację epidemiologiczną danej populacji ludzi. Przykładem są Indie, gdzie odnotowano masowy wzrost zachorowań u ludzi wywołanych przez reasortanty wirusa o genotypie G9 jak i P[11]. Pojawienie się nowych szczepów RVA o odmiennych genotypach niż te obecne w szczepionkach było podstawą przygotowania i wprowadzenia do czynnej immunizacji osób w Indiach preparatu Rotavac®, zawierającego atenuowany szczep G9P[11] – reasortant RVA bydła i człowieka [9]. Podobną sytuację obserwuje się w Azji i Ameryce Płd., gdzie od 2008 r. ma miejsce stały wzrost zakażeń ludzi zoonotycznym szczepem G12P[6] [40]. Ze względu na brak jednoznacznych informacji nt. skuteczności dostępnych szczepionek w zapobieganiu zakażeniom wywołanym przez nowe genotypy wirusa niezbędne wydaje się prowadzenie stałego nadzoru epidemiologicznego zakażeń połączonego z identyfikacją genotypów wirusa, który pozwoli ocenić rzeczywisty wpływ stosowania szczepionek na selekcję i zmienność profilu genotypowego krążących szczepów RVA.

7. Podsumowanie

Zjawisko reasortacji genetycznej obserwowane pomiędzy RVA zwierząt i człowieka może być bardziej powszechne niż świadczą o tym doniesienia naukowe. Pojawiające się reasortantanty RVA posiadają dużą zdolność adaptacji do nowych gospodarzy i mogą szybko rozprzestrzenić się w ich populacjach. Obecność zwierzęcego rezerwuaru RVA patogennych dla człowieka, a także pojawianie się ognisk choroby wywołanych przez zoonotyczne szczepy wirusa wskazuje na potrzebę monitorowania tego zjawiska. Istotne znaczenie w zapobieganiu szerzenia się zakażeń i pojawianiu się ciężkich przypadków choroby u ludzi mają programy immunoprofilaktyczne. Niemniej jednak skuteczność obecnie dostępnych szczepionek może nie być wystarczająca w stosunku do nowych szczepów wirusa, a indukowana przez nie odporność nie w pełni chronić szczepione osoby w przypadku zakażeń szczepami RVA o odmiennych genotypach niż te obecne w szczepionkach.

Podziękowanie

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/N/NZ7/00043.

Piśmiennictwo

1. Adams W.R., Kraft L.M.: Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, **141**, 359–360 (1963)
2. Angel J., Franco M.A., Greenberg H.B.: Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 529–539 (2007)
3. Bányai K., Esona M.D., Kerin T.K., Hull J.J., Mijatovic S., Vásconez N., Torres C., de Filippis A.M., Gentsch J.R..: Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rota-

virus strain, G11P[6], from Ecuador. *Arch. Virol.* **154**, 1823–1829 (2009)
4. Bányai K., Esona M.D., Mijatovic S., Kerin T.K., Pedreira C., Mercado J., Balmaseda A., Perez M.C., Patel M.M., Gentsch J.R.: Zoonotic bovine rotavirus strain in a diarrheic child, Nicaragua. *J. Clin. Virol.* **46**, 391–393 (2009)
5. Bányai K., Kemenesi G., Budinski I., Földes F., Zana B., Marton S., Varga-Kugler R., Oldal M., Kurucz K., Jakab F.: Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* **48**, 19–26 (2017)
6. Bányai K., László B., Duque J., Steele A.D., Nelson E.A., Gentsch J.R., Parashar U.D.: Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*, **30**, 122–130 (2012)
7. Bányai K., Papp H., Dandár E., Molnár P., Mihály I., Van Ranst M., Martella V., Matthijnssens J.: Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 1140–1144 (2010)
8. Barreiros M.A., Alfieri A.A., Alfieri A.F., Médici K.C., Leite J.P.: An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7],G3 and P[7],G5. *Vet. Res. Commun.* **27**, 505–512 (2003)
9. Bhandari N., India Rotavirus Vaccine Group i wsp.: Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, **383**, 2136–2143 (2014)
10. Bonica M.B., Zeller M., Van Ranst M., Matthijnssens J., Heylen E.: Complete genome analysis of a rabbit rotavirus causing gastroenteritis in a human infant. *Viruses*, **17**, 844–856 (2015)
11. Ciarlet M., Schödel F.: Development of a rotavirus vaccine: clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq. *Vaccine*, **27**, G72–G81 (2009)
12. Cortese M.M., Tate J.E., Simonsen L., Edelman L., Parashar U.D.: Reduction in gastroenteritis in United States children and correlation with early rotavirus vaccine uptake from national medical claims databases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **29**, 489–494 (2010)
13. Cowley D., Donato C.M., Roczo-Farkas S., Kirkwood C.D.: Novel G10P[14] rotavirus strain, northern territory, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1324–1327 (2013)
14. Degiuseppe J.I., Beltramino J.C., Millán A., Stupka J.A., Parra G.I.: Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, 367–371 (2013)
15. Dennehy P.H., Bertrand H.R., Silas P.E., Damaso S., Friedland L.R., Abu-Elyazeed R.: Coadministration of RIX4414 oral human rotavirus vaccine does not impact the immune response to antigens contained in routine infant vaccines in the United States. *Pediatrics*, **122**, 1062–1066 (2008)
16. Donato C.M., Manuelpillai N.M., Cowley D., Roczo-Farkas S., Buttery J.P., Crawford N.W., Kirkwood C.D.: Genetic characterization of a novel G3P[14] rotavirus strain causing gastroenteritis in 12 year old Australian child. *Infect. Genet. Evol.* **25**, 97–109 (2014)
17. Dong H.J., Qian Y., Huang T., Zhu R.N., Zhao L.Q., Zhang Y., Li R.C., Li Y.P.: Identification of circulating porcine-human reassortant G4P[6] rotavirus from children with acute diarrhea in China by whole genome analyses. *Infect. Genet. Evol.* **20**, 155–162 (2013)
18. Duan Z.J., Fang Z.Y. i wsp.: Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1614–1617 (2007)
19. Esona M.D., Gentsch J. i wsp.: Determination of the G and P types of previously nontypeable rotavirus strains from the African Rotavirus Network, 1996–2004: Identification of unusual G types. *J. Infect. Dis.* **202**, 49–54 (2010)
20. Esona M.D., Roy S., Rungsrisuriyachai K., Sanchez J., Vasquez L., Gomez V., Rios L.A., Bowen M.D., Vazquez M.: Characterization of a triple-recombinant, reassortant rotavirus strain from the Dominican Republic. *J. Gen. Virol.* **98**, 134–142 (2017)
21. Falcone E., Busi C., Lavazza A., Monini M., Bertoletti M., Canelli E., Vignolo E., Ruggeri F.M., Boniotti M.B.: Molecular characterization of avian rotaviruses circulating in Italian poultry flocks. *Avian Pathol.* **44**, 509–515 (2015)
22. Fischer T.K., Viboud C., Parashar U., Malek M., Steiner C., Glass R., Simonsen L.: Hospitalizations and deaths from diarrhea and rotavirus among children of <5 years of age in the United States, 1993–2003. *J. Infect. Dis.* **195**, 1117–1125 (2007)
23. Flewett T.H., Bryden A.S., Davies H., Woode G.N., Bridger J.C., Derrick J.M.: Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*, **2**, 61–63 (1974)
24. Fukusho A., Shimizu Y., Ito Y.: Isolation of cytopathic porcine rotavirus in cell roller culture in the presence of trypsin. *Arch. Virol.* **69**, 49–60 (1981)
25. Gauchan P., Sasaki E., Nakagomi T., Do L.P., Doan Y.H., Mochizuki M., Nakagomi O.: Whole genotype constellation of prototype feline rotavirus strains FRV-1 and FRV64 and their phylogenetic relationships with feline-like human rotavirus strains. *J. Gen. Virol.* **96**, 338–350 (2015)
26. Giaquinto C., Van Damme P., Huet F., Gothefors L., Maxwell M., Todd P., da Dalt L., REVEAL Study Group.: Clinical consequences of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004–2005: the REVEAL study. *J. Infect. Dis.* **195**, 26–35 (2007)
27. Gouvea V., de Castro L., Timenetsky M.C., Greenberg H., Santos N.: Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1408–1409 (1994)
28. Hasegawa A., Inouye S., Matsuno S., Yamaoka K., Eko R., Suharyono W.: Isolation of human rotaviruses with a distinct RNA electrophoretic pattern from Indonesia. *Microbiol. Immunol.* **28**, 719–722 (1984)
29. He B., Tu C. i wsp.: Characterization of a novel G3P[3] rotavirus isolated from a lesser horseshoe bat: a distant relative of feline/canine rotaviruses. *J. Virol.* **87**, 12357–12366 (2013)
30. Hoshino Y., Honma S., Jones R.W., Ross J., Santos N., Gentsch J.R., Kapikian A.Z., Hesse R.A.: A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. *Virology*, **332**, 177–188 (2005)
31. Huang P., Xia M., Tan M., Zhong W., Wei C., Wang L., Morrow A., Jiang X.: Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol.* **86**, 4833–4843 (2012)
32. Iturriza Gómara M., Kang G., Mammen A., Jana A.K., Abraham M., Desselberger U., Brown D., Gray J.: Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2541–2547 (2004)
33. Iturriza-Gómara M., Auchterlonie I.A., Zaw W., Molyneaux P., Desselberger U., Gray J.: Rotavirus gastroenteritis and central nervous system (CNS) infection: characterization of the VP7 and VP4 genes of rotavirus strains isolated from paired fecal and cerebrospinal fluid samples from a child with CNS disease. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4797–4799 (2002)
34. Iturriza-Gómara M., Gray J. i wsp.: Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol. Infect.* **139**, 895–909 (2011)
35. Jere K.C., Seheri M.L. i wsp.: Novel NSP1 genotype characterised in an African camel G8P[11] rotavirus strain. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 58–66 (2014)

36. Kaplon J., Fremy C., Bernard S., Rehby L., Aho S., Pothier P., Ambert-Balay K.: Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. *Vaccine*, **31**, 2433–2440 (2013)
37. Kelkar S.D., Ayachit V.L.: Circulation of group A rotavirus subgroups and serotypes in Pune, India, 1990–1997. *J. Health Popul. Nutr.* **18**, 163–170 (2000)
38. Komoto S., Maeno Y., Tomita M., Matsuoka T., Ohfu M., Yodoshi T., Akeda H., Taniguchi K.: Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhoea and encephalopathy in Japan. *J. Gen. Virol.* **94**, 1568–1575 (2013)
39. Korycka M.: Epidemiologia zakażeń rotawirusowych u dzieci. *Przegl. Epidemiol.* **55**, 275–279 (2001)
40. Leshem E., Lopman B., Glass R., Gentsch J., Bányai K., Parashar U., Patel M.: Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **14**, 847–856 (2014)
41. Leung A.K., Kellner J.D., Davies H.D.: Rotavirus gastroenteritis. *Adv. Ther.* **22**, 476–487 (2005)
42. Li D.D., Duan Z.J., Zhang Q., Liu N., Xie Z.P., Jiang B., Steele D., Jiang X., Wang Z.S., Fang Z.Y.: Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China. *J. Clin. Virol.* **42**, 141–148 (2008)
43. Martella V., Buonavoglia C. i wsp.: Lapine rotaviruses of the genotype P[22] are widespread in Italian rabbitries. *Vet. Microbiol.* **111**, 117–124 (2005)
44. Martella V., Krisztián B., Matthijnssens J., Buonavoglia C., Ciarlet M.: Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* **140**, 246–255 (2010)
45. Martinez M., Galeano M.E., Akopov A., Palacios R., Russomando G., Kirkness E.F., Parra G.I.: Whole-genome analyses reveals the animal origin of a rotavirus G4P[6] detected in a child with severe diarrhea. *Infect. Genet. Evol.* **27**, 156–162 (2014)
46. Marton S., Dóró R., Fehér E., Forró B., Ihász K., Varga-Kugler R., Farkas S.L., Bányai K.: Whole genome sequencing of a rare rotavirus from archived stool sample demonstrates independent zoonotic origin of human G8P[14] strains in Hungary. *Virus Res.* **227**, 96–103 (2017)
47. Mascarenhas J.D., Bezerra D.A., Silva R.R., Silva M.J., Júnior E.C., Soares L.S.: Detection of the VP6 gene of group F and G rotaviruses in broiler chicken fecal samples from the Amazon region of Brazil. *Arch. Virol.* **161**, 2263–2268 (2016)
48. Matthijnssens J., Ons E., De Coster S., Conceicao-Neto N., Gryspeerdt A., Van Ranst M., Raue R.: Molecular characterization of equine rotaviruses isolated in Europe in 2013: implications for vaccination. *Vet. Microbiol.* **176**, 179–185 (2015)
49. Matthijnssens J., Rahman M., Martella V., Xuelei Y., De Vos S., De Leener K., Ciarlet M., Buonavoglia C., Van Ranst M.: Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J. Virol.* **80**, 3801–3810 (2006)
50. Matthijnssens J., Van Ranst M. i wsp.: Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J. Virol.* **83**, 2917–2929 (2009)
51. Matthijnssens J., Van Ranst M. i wsp.: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* **156**, 1397–1413 (2011)
52. Matthijnssens J., Van Ranst M.: Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 426–433 (2012)
53. Medici M.C., Tummolo F., Bonica M.B., Heylen E., Zeller M., Calderaro A., Matthijnssens J.: Genetic diversity in three bovine-like human G8P[14] and G10P[14] rotaviruses suggests independent interspecies transmission events. *J. Gen. Virol.* **96**, 1161–1168 (2015)
54. Midgley S.E., Böttiger B. i wsp.: Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* **4**, 238–245 (2012)
55. Mihalov-Kovács E., Gellért Á., Marton S., Farkas S.L,. Fehér E., Oldal M., Jakab F., Martella V., Bányai K.: Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 660–663 (2015)
56. Mladenova Z., Papp H., Lengyel G., Kisfali P., Steyer A., Steyer A.F., Esona M.D., Iturriza-Gómara M., Bányai K.: Detection of rare reassortant G5P[6] rotavirus, Bulgaria. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 1676–1684 (2012)
57. Mukherjee A., Ghosh S., Bagchi P., Dutta D., Chattopadhyay S., Kobayashi N., Chawla-Sarkar M.: Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9P[19] and G10P[6] strains from North-eastern India: evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1343–1346 (2011)
58. Mukherjee A., Mullick S., Deb A.K., Panda S., Chawla-Sarkar M.: First report of human rotavirus G8P[4] gastroenteritis in India: evidence of ruminants-to-human zoonotic transmission. *J. Med. Virol.* **85**, 537–545 (2013)
59. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny. (2015) Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2015 roku, http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2015/Ch_2015.pdf. (20.11.2017)
60. Nemoto M., Ryan E., Lyons P., Cullinane A.: Molecular characterisation of equine group A rotaviruses in Ireland (2011–2015). *Vet. J.* **226**, 12–14 (2017)
61. Otto P., Liebler-Tenorio E.M., Elschner M., Reetz J., Löhren U., Diller R.: Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). *Avian Dis.* **50**, 411–418 (2006)
62. Pager C.T., Alexander J.J., Steele A.D.: South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8*, and VP7 genes. *J. Med. Virol.* **62**, 208–216 (2000)
63. Papp H., Bányai K. i wsp.: Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infect. Genet. Evol.* **19**, 71–80 (2013)
64. Papp H., László B., Jakab F., Ganesh B., De Grazia S., Matthijnssens J., Ciarlet M., Martella V., Bányai K.: Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* **165**, 190–199 (2013)
65. Papp H., Malik Y.S., Farkas S.L., Jakab F., Martella V., Bányai K.: Rotavirus strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids. *Virus Dis.* **25**, 215–222 (2014)
66. Papp H., Matthijnssens J., Martella V., Ciarlet M., Bányai K.: Global distribution of group A rotavirus strains in horses: a systematic review. *Vaccine*, **48**, 5627–5633 (2013)
67. Papp H., Mihalov-Kovács E., Dóró R., Marton S., Farkas S.L., Giammanco G.M., De Grazia S., Martella V., Bányai K.: Full-genome sequencing of a Hungarian canine G3P[3] rotavirus A strain reveals high genetic relatedness with a historic Italian human strain. *Virus Genes*, **50**, 310–315 (2015)
68. Parashar U.D., Bresee J.S., Gentsch J.R., Glass R.I.: Rotavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 561–570 (1998)
69. Parashar U.D., Hummelman E.G., Bresee J.S., Miller M.A., Glass R.I.: Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 565–572 (2003)
70. Park S., Cho K. i wsp.: Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains

isolated from cattle in South Korea. *Vet. Microbiol.* **152**, 55–66 (2011)
71. Pauly M., Oni O.O., Sausy A., Owoade A.A., Adeyefa C.A.O., Muller C.P., Hübschen J.M., Snoeck C.J.: Molecular epidemiology of Avian Rotaviruses Group A and D shed by different bird species in Nigeria. *Virol. J.* DOI: 10.1186/s12985-017-0778-5 (2017)
72. Pearson N.J., Fulton R.W., Issel C.J., Springer W.T.: Prevalence of rotavirus antibody in chickens and horses in Louisiana, USA. *Vet. Rec.* **110**, 58–59 (1982)
73. Pedley S., Bridger J.C., Chasey D., McCrae M.A.: Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *J. Gen. Virol.* **67**, 131–137 (1986)
74. Pourasgari F., Kaplon J., Karimi-Naghlani S., Fremy C., Otarod V., Ambert-Balay K., Mirjalili A., Pothier P.: The molecular epidemiology of bovine rotaviruses circulating in Iran: a two-year study. *Arch. Virol.* **161**, 3483–3494 (2016)
75. Quiroz-Santiago C., Vázquez-Salinas C., Natividad-Bonifacio I., Barrón-Romero B.L., Quiñones-Ramírez E.I.: Rotavirus G2P[4] detection in fresh vegetables and oysters in Mexico City. *J. Food Prot.* **77**, 1953–1999 (2014)
76. Ramani S., Hu L., Venkataram Prasad B.V., Estes M.K.: Diversity in rotavirus-host glycan interactions: A "sweet" spectrum. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 263–273 (2016)
77. Roczo-Farkas S., Kirkwood C.D., Bines J.E. and the Australian Rotavirus Surveillance Group.: Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2015. *Commun. Dis. Intell.* **40**, 527–538 (2016)
78. Saif L.J., Bohl E.H., Kohler E.M., Hughes J.H.: Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agent) of swine. *Am. J. Vet. Res.* **38**, 13–20 (1977)
79. Santos N., Lima R.C., Pereira C.F., Gouvea V.: Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2727–2729 (1998)
80. Sato K., Inaba Y., Shinozaki T., Fujii R., Matumoto M.: Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Arch. Virol.* **69**, 155–160 (1981)
81. Soriano-Gabarró M., Mrukowicz J., Vesikari T., Verstraeten T.: Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, S7–S11 (2006)
82. Steyer A., Bajzelj M., Iturriza-Gómara M., Mladenova Z., Korsun N., Poljsak-Prijatelj M.: Molecular analysis of human group A rotavirus G10P[14] genotype in Slovenia. *J. Clin. Virol.* **49**, 121–125 (2010)
83. Stupka J.A., Carvalho P., Amarilla A.A., Massana M., Parra G.I.: National Rotavirus Surveillance in Argentina: high incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 1225–1231 (2009)
84. Teodoroff T.A., Tsunemitsu H., Okamoto K., Katsuda K., Kohmoto M., Kawashima K., Nakagomi T., Nakagomi O.: Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1377–1384 (2005)
85. Than V.T., Park J.H., Chung I.S., Kim J.B., Kim W.: Whole-genome sequence analysis of a Korean G11P[25] rotavirus strain identifies several porcine-human reassortant events. *Arch. Virol.* **158**, 2385–2393 (2013)
86. Theuns S., Heylen E., Zeller M., Roukaerts I.D., Desmarets L.M., Van Ranst M., Nauwynck H.J., Matthijnssens J.: Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. *J. Virol.* **89**, 1043–1057 (2015)
87. Tichopád A., Müllerová J., Jackowska T., Nemes E., Pazdiora P., Sloesen B., Štefkovičová M.: Cost Burden of Severe Community-Acquired Rotavirus Gastroenteritis Requiring Hospitalization in the Czech Republic, Slovakia, Poland, and Hungary: A Retrospective Patient Chart Review. *Value Health Reg. Issues.* **10**, 53–60 (2016)
88. Timenetsky M.C., Santos N., Gouvea V.: Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2622–2624 (1994)
89. Tonietti Pde O., da Hora A.S., Silva F.D., Ferrari K.L., Brandão P.E., Richtzenhain L.J., Gregori F.: Simultaneous detection of group a rotavirus in swine and rat on a pig farm in Brazil. *Scientific World Journal*, **16**, DOI: 10.1155/2013/648406 (2013)
90. Van Damme P., Giaquinto C., Maxwell M., Todd P., Van der Wielen M., REVEAL Study Group: Distribution of rotavirus genotypes in Europe, 2004–2005: the REVEAL Study. *J. Infect. Dis.* **195**, S17–S25 (2007)
91. Van der Wielen M., Van Damme P.: Pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine in special populations: a review of data from the rotavirus efficacy and safety trial. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 495–501 (2008)
92. van Zyl W.B., Page N.A., Grabow W.O., Steele A.D., Taylor M.B.: Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4554–4560 (2006)
93. Wang Y.H., Kobayashi N., Nagashima S., Zhou X., Ghosh S., Peng J.S., Hu Q., Zhou D.J., Yang Z.Q.: Full genomic analysis of a porcine-bovine reassortant G4P[6] rotavirus strain R479 isolated from an infant in China. *J. Med. Virol.* **82**, 1094–1102 (2010)
94. Winiarczyk S., Grądzki Z., Pejsak Z.: Występowanie zakażeń rotawirusowych u prosiąt w krajowych gospodarstwach wielkotowarowych. *Med. Wet.* **49**, 359–360 (1993)
95. Wu F.T., Bányai K., Wu H.S., Yang D.C., Lin J.S., Hsiung C.A., Huang Y.C., Hwang K.P., Jiang B., Gentsch J.R.: Identification of a G8P[14] rotavirus isolate obtained from a Taiwanese child: evidence for a relationship with bovine rotaviruses. *Jpn. J. Infect. Dis.* **65**, 455–457 (2012)
96. Ye S., Whiley D.M., Ware R.S., Sloots T.P., Kirkwood C.D., Grimwood K., Lambert S.B.: Detection of viruses in weekly stool specimens collected during the first 2 years of life: A pilot study of five healthy Australian infants in the rotavirus vaccine era. *J. Med. Virol.* **89**, 917–921 (2017)
97. Yodmeeklin A., Khamrin P., Chuchaona W., Kumthip K., Kongkaew A., Vachirachewin R., Okitsu S., Ushijima H., Maneekarn N.: Analysis of complete genome sequences of G9P[19] rotavirus strains from human and piglet with diarrhea provides evidence for whole-genome interspecies transmission of nonreassorted porcine rotavirus. *Infect. Genet. Evol.* **47**, 99–108 (2017)
98. Yolken R.H., Barbour B., Wyatt R.G., Kalica A.R., Kapikian A.Z., Chanock R.M.: Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of rotaviruses from different animal species. *Science*, **201**, 259–262 (1978)
99. Yoshida A., Kawamitu T., Tanaka R., Okumura M., Yamakura S., Takasaki Y., Hiramatsu H., Momoi T., Iizuka M., Nakagomi O.: Rotavirus encephalitis: detection of the virus genomic RNA in the cerebrospinal fluid of a child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**, 914–916 (1995)
100. Zeller M., Rahman M., Heylen E., De Coster S., De Vos S., Arijs I., Novo L., Verstappen N., van Ranst M., Matthijnssens J.: Rotavirus incidence and genotype distribution before and after national rotavirus vaccine introduction in Belgium. *Vaccine*, **28**, 7507–7513 (2010)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 166–178
http://www.pm.microbiology.pl

THE ROLE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN THE CLINICAL DIAGNOSIS OF DIABETIC PATIENTS

Renata Barbara Klekotka[1], Elżbieta Mizgała-Izworska[2]*, Witold Drzastwa[2], Bogdan Mazur[1]

[1] Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Medical University of Silesia
[2] Department of Family Medicine, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Medical University of Silesia

Submitted in September 2017, accepted in February 2018

Abstract: Discovering interactions between the etiology of the infection and diabetic patients' immune system activity may be essential for the relevant clinical diagnosis. The dynamics of colonization of the nasal vestibule by *Staphylococcus aureus* and the development of the prevention strategies against infection are different for various populations. Moreover, the colonization of the nasal vestibule might involve both molecular and epidemiological ctorsfa. Researchers have reported that the identification of methicillin-resistant strains *S. aureus* (MRSA) with similar molecular characteristics allows to assess the ability of the microorganism to spread and the risk of infection in diabetic patients. Knowledge of these characteristics allows to take precautions in patients exposed to *S. aureus*. *S. aureus* is an ethiological factors of many severe diseases both in people with weakened immune system and in healthy individuals. Usually, excess weight and obesity contribute to the incidence of diabetes mellitus type 2 (DM2). However, the colonization by *S. aureus* is a probable risk factor for infection. Among *S. aureus* virulence factors, superantigens (SAgs) are essential for pathogenicity. The long-term effect of the superantigen toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) might be glucose intolerance. This toxin also induces systemic inflammation as a result of the increased exotoxin concentration in blood, and, therefore, may be the causative factor of diabetes. Chronic exposure to staphylococcal superantigens may contribute to the development of diabetes, suggesting a need to conduct targeted therapies against *S. aureus* superantigens.

1. Introduction. 2. Risk factors for infection in patients with diabetes. 2.1. Immunodeficiency. 2.2. Obesity 2.3. Staphylococcal carriage. 3. Staphylococcal infections in patients with diabetes. 3.1. Staphylococcal superantigens. 3.2. Skin and soft tissue infections. 3.3.Diabetic foot syndrome. 3.4. Sepsis. 3.5. Infective endocarditis. 3.6. Acute purulent meningitis. 4. Vaccination. 5. Conclusions

Rola *Staphylococcus aureus* w diagnostyce klinicznej pacjentów z cukrzycą

Streszczenie: Znajomość zależności między etiologią zakażenia, a aktywnością układu odpornościowego u pacjentów z cukrzycą może mieć kluczowe znaczenie dla diagnostyki klinicznej. Dynamika kolonizacji przedsionka nosa przez *Staphylococcus aureus* oraz zalecenia dotyczące gronkowcowych zakażeń, będą odmienne dla różnych populacji. Charakterystyka kolonizacji przedsionka nosa może obejmować cechy molekularne i czynniki epidemiologiczne. Naukowcy donoszą, że identyfikacja nosicielstwa, szczepami *S. aureus* opornymi na metycylinę (MRSA) o podobnych cechach genotypowych, pozwala ocenić zdolność rozpowszechniania się drobnoustroju oraz ryzyko zakażenia pacjentów z cukrzycą. Znajomość tych właściwości umożliwia wprowadzenie działań zapobiegających zakażeniom wywołanym przez *S. aureus*. Bakteria ta jest czynnikiem etiologicznym wielu ciężkich chorób zarówno u osób z upośledzoną odpornością, jak i u zdrowej populacji. Nadwaga i otyłość stanowią czynnik ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2 (DM2). Natomiast nosicielstwo *S. aureus* może przyczynić się do rozwoju infekcji. Istotne dla patogenności czynniki zjadliwości *S. aureus*, to superantygeny (SAgs). Zaliczamy do nich toksyny zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1), których długotrwałym efektem działania może być nietolerancja glukozy. Wspomniane toksyny indukują również ogólnoustrojowe zapalenie, w wyniku zwiększonego stężenia egzotoksyn we krwi, a zatem mogą być czynnikiem, który indukuje hiperglikemię. Przewlekła ekspozycja na superantygeny gronkowcowe może prowadzić do rozwoju cukrzycy, co sugeruje potrzebę prowadzenia terapii ukierunkowanej na superantygeny *S. aureus*.

1. Wstęp. 2. Czynniki ryzyka wystąpienia zakażenia u pacjentów z cukrzycą. 2.1. Niedobór odporności. 2.2. Otyłość 2.3. Nosicielstwo gronkowcowe. 3. Zakażenia gronkowcowe u pacjentów z cukrzycą. 3.1. Superantygeny gronkowcowe. 3.2. Infekcje skóry i tkanek miękkich. 3.3. Zespół stopy cukrzycowej. 3.4. Sepsa. 3.5. Infekcyjne zapalenie wsierdzia. 3.6. Ostre ropne zapalenie opon mózgowych. 4. Szczepienia. 5. Wnioski

Key words: diabetic patients, *Staphylococcus aureus*
Słowa kluczowe: pacjenci chorujący na cukrzycę, *Staphylococcus aureus*

1. Introduction

The test results reveal that patients with diabetes tend to be at higher risk ratio for infections about 1.21 when compared to patients without diabetes [52]. Infections that occur in patients with diabetes have severe course and can be even life-threatening. First of all, clinical symptoms are often mild and masked by the chronic complications of diabetes, which leads to the late medical diagnosis. Secondly, the defect in humoral immunity leads to the inhibition of the normal body's response to the infection [12]. Casqueiro et al.

* Corresponding author: Elżbieta Mizgała-Izworska, Department of Family Medicine, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, (Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej SUM), 3-go Maja 13/15, 41-800 Zabrze, Poland; phone: +48 32 370 43 58; e-mail: emizgla@o2.pl

confirm that hyperglycemia environment can result in a reduction of the function: lymphocytes T, neutrophils, secretion of inflammatory cytokines and anti-oxidant system [5]. A high percentage of *Staphylococcus aureus* which is the etiological factor for diabetic foot syndrome (DFS) and skin and soft tissue infections (SSTI) confirms that diabetic patients are particularly vulnerable to infections caused by this microorganism [29, 66]. Given the fact that *S. aureus* is an independent predictor of mortality, monitoring of this microorganism must be treated as a priority, as reported by Hernandez et al., in their studies. Therefore, adequate knowledge of these pathogens involved in a potentially invasive disease, is the important tool for effective treatment using antibacterial agents with a properly chosen spectrum of activity [18].

Vu et al., in their study demonstrated adipocytes with insulin resistance resulting from chronic exposure to superantigen TSST-1 [65].

Rodríguez et al. state that the spread of the different strains of *S. aureus* can be controlled through the knowledge of their molecular characteristics and epidemiological mechanisms. In patients with high risk of diabetes type 2 the presence of MRSA colonization of similar molecular characteristics discloses the ability of incidence and risk of *S. aureus* infection [48]. Elimination of *S. aureus* carriage seems to play an important role in the prevention of infections in patients with diabetes who are about to undergo major surgery, which was confirmed by Muñoz et al., revealing an increased frequency of surgical site infections after major heart surgery. Poindexter et al. reports not only confirm increased incidence of staphylococcal colonization among diabetic patients compared to patients without diabetes but also reveal that still the important factors responsible for the higher rates of *S. aureus* carriage in the nasal cavity are not known. Another important issue is the need to control antibiotics' resistance in hospital settings [44].

The aim of the study is to determine the impact of *S. aureus* infection on the clinical course of diabetes mellitus.

2. Risk factors for infection in patients with diabetes

Diabetes mellitus is the metabolic disease caused by a defect in insulin action or secretion, which leads to hyperglycemia [55]. As a result of poor glycemic control or ketoacidosis, secondary defects in phagocytic cells can occur in diabetic patients. The process of chemotaxis and phagocytosis, when normally bacteria are killed by neutrophils, can be weakened in patients with diabetes [49]. Infectious diseases are common in diabetic patients. The main pathogenic mechanisms are: the increased virulence of certain pathogens in hyperglycemic environment, reduction of chemotaxis activity and production of the interleukins in response to the infection, as well as a decrease in the activity of phagocytes and the immobilization of neutrophils [3, 5, 17].

2.1. Immunodeficiency

Infection in patients with diabetes causes many pathophysiological changes. The complement system contains plasma proteins and cell surface proteins which promote opsonization and bacterial phagocytosis by leukocytes. The complement system is activated and may increase the lysis of microorganism and mediates a B-cell antibody production [9]. Decreased level of C4 was observed in patients with DM and that may cause malformed neutrophils formation and decreased response to cytokines. In the process of phagocytosis, lipopolysaccharide (LPS) induces mononuclear cells and monocytes, but in response to stimulation, they release lower amounts of interleukin-1 (IL-1), and interleukin-6 (IL-6). Lymphocytes and macrophages decrease IL-10 production as a consequence of increased glycation. Glycation reduces also the myeloid cells' expression of the cell surface of the major histocompatibility complex class I (MHC), and this reduces cell-mediated immunity. Lymphocytes T and NK cells reduce the release of interferon gamma (IFN-γ). Additionally, T cells and macrophages inhibit tumor necrosis factor (TNF-α) [46, 30]. Impaired immunological defense in hyperglycemic environment applies to phagocytic activity, polymorphonuclear leukocytes and chemotaxis. Hyperglycemic environment increases the intracellular concentration of glucose in tissues that do not consume insulin, and this decreases the concentration of NADPH. Exhaustion of NADPH, as a cofactor, disables the action of the molecules that play an important role in the antioxidative mechanisms of a cell. As a result, this leads to the increase in tissue sensitivity to oxidative stress. Some studies have shown that HbA1c < 8.0% has an influence on the proliferative activity of lymphocytes Th (helper cells – CD4+) and their response to antigens. In diabetic patients glycation of the immunoglobulin is proportional to the increasing concentration of HbA1c, which may impair the biological function of antibodies [5, 22].

2.2. Obesity

Numerous studies have shown the strong relationship between obesity and diabetes [9, 39, 55]. In obese patients adipocytes function is impaired and this leads to metabolic disorders and chronic inflammation. Obesity and diabetes mellitus type 2 lead to microbiome

changes, staphylococcal carriage, and noticeable infection. An important role in the development of DM2 is played by e.g. superantigen TSST-1, as a result of the presence of the long-term glucose intolerance. In vitro and in vivo studies have shown that the chronic presence of exotoxin TSST-1 induces not only insulin resistance but also lipolysis and inflammation in adipocytes [65]. However, other studies have shown a variety of risk factors and therefore, not all the people with obesity develop DM2 [70]. The comparison study of B lymphocytes and inflammatory cytokines in obese diabetic patients without symptoms of diabetes has shown similar properties and impaired functioning. Obese people in response to the inflammation secrete pro-inflammatory cytokines typical for the chronic infection. Zhai et al. compared obese patients with and without diabetes and have shown increased production of polyclonal antibodies by adaptive B-cells in patients with diabetes. Additionally, in these patients, there is an impaired response to vaccination, and there is often a generalized inflammation [70]. Dai et al. conducted studies in diabetic patients with elevated BMI and with normal BMI, and evaluated the expression and the function of the proinflammatory cytokines released by T-cells and monocytes [7]. It was found that obese patients with diabetes have increased production of proinflammatory cytokines, and their adipose tissue began to accumulate more M1-type macrophages and T-lymphocytes stimulating IL-17 production. The comparison of IL-17 production in obese patients with and without diabetes has shown that only in obese diabetic patients the release of IL-17 was upregulated. Production of IFN-y by T cells was increased in both study groups. Activation of monocytes in obese with DM2 is possible by the action of both IFN-y and IL-17, whereas in diabetic patients with normal BMI only IFN-y functions properly. Dai et al. revealed that the immune system and BMI play an important role in pathogenesis of DM2 [7]. DeFuria et al. have highlighted that in the development of inflammation in obesity and/or DM2, B-lymphocytes play an important role [9]. In the case of malfunction, these cells formed a mechanism dependent on contact B-cells promote proinflammatory T-cell functions, resulting in stimulated secretion of proinflammatory cytokines. Researchers suggest that the target of inflammation treatment in obese and / or diabetic patients are B-lymphocytes [9]. Frasca et al., evaluated the effects of an influenza vaccine. The study group consisted of obese patients in different age. The evaluation of the immune response after vaccination has demonstrated that leptin causes disorders of B-cell levels in obese patients. This was confirmed by an increase in IL-10 secretion and immune activation markers (TLR4, TNF-α, micro-RNA) [13].

2.3. Staphylococcal carriage

S. aureus methicillin resistant strains (MRSA) are pathogenic factors of many diseases. Carriage of *S. aureus* acts as the pathological and epidemiological factor in the development of infection. The front of the nostrils is an ecological niche for the development of *S. aureus* carriage. According to the *S. aureus* carriage healthy people can be divided into three groups – about 20% of people are solid carriers, 60% are sporadic carriers and about 20% who were almost never carriers of *S. aureus.* Carriage (particularly MRSA) is dangerous in patients with skin wound, who are undergoing surgery, hemodialysis or peritoneal dialysis (CAPD), infected with HIV, AIDS patients and patients with intravascular devices. The high risk group would include diabetic patients due to increased frequency of chronic wounds, the presence of intravascular devices and common infectious diseases.

The treatment of infections caused by MRSA makes many problems arise and staphylococcal infections prevention is growing in importance. Studies show that as the result of the elimination of carriage in high risk groups of patients, the reduction in the number of infections is reported. Carriage elimination is critical in preventing infections in high risk groups of patients, therefore further research is needed to determine the exact high risk group [23].

The mechanisms leading to the carriage of *S. aureus* in the nasal cavity are multifactorial. *S. aureus* nasal cavity carriage can be the result of predisposed conditions and inhibition. There are four reasons for nasal colonization by *S. aureus*. Firstly, *S. aureus* must come into contact with the nasal cavity. Secondly, *S. aureus* must adhere to specific receptors in the nasal cavity. Thirdly, *S. aureus* must overcome the organism's defense systems and ultimately *S. aureus* must be able to multiply in the nasal cavity. Wertheim et al. conducted study on the hospitalized patients with bacteraemia caused by *S. aureus* who were carriers of this bacteria and compared results with patients with bacteraemia without carriage of *S. aureus*. The researchers found that 21% patients had their nasal cavities colonized with *S. aureus* [67].

The constant presence of *S. aureus* in the nasal cavity is one of the etiological factors of recurrent infection. Ecological niche for *S. aureus* is the front part of the nostrils, where the re-colonization occurs during a few weeks to several months. The incidence of carriage depends on many factors, including diabetes which contributes to the occurrence of carriage, sometimes for many years. *S. aureus* affinity to the epithelium of the nasal cavity is dependent on the teichoic, lipoteichoic acids and fibronectin, which adhere to the epithelial cells [61]. Colonization of the front part of the nostrils by *S. aureus* promotes colonization of other

parts of the body, mucous membranes or abraded skin. Microorganism's invasiveness is associated with the presence of cell surface adhesins, secretion of exotoxins inhibiting phagocytosis. The presence of these factors facilitates feeding the bacteria and impairs immune system responses. The most common staphylococcal superantigens that can be identified in the nasal cavity are: staphylococcal enterotoxin SE and toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1). They stimulate T-cells and macrophages to release inflammatory cytokines. Superantigens cause massive release of cytokines that directly link to the variable domains of T-cell receptor major histocompatibility complex class II molecules on antigen presenting cells. Polyclonal T-cells cause the massive release of cytokines which can lead to the toxic shock syndrome [14, 37]. Burian et al. led the research explaining why enterotoxin gene cluster EGC SAgs do not work properly in patients who are carriers of *S. aureus* [4]. The members of EGC like: SEG, SELN, SELO, SEI, SELM, and/or SELU, activate T-cells and antibody response. Also T-cells are activated by non-EGC SAgs like: SEC, SEA or TSST-1, and their antibodies are common in healthy population and patients with bacteraemia. SAgs genes are transcribed, in the nasal cavity, though antibodies against non-EGC and anti-EGC. Carriers demonstrate the presence of antibodies against SEA and SEC, which are mitogenic effect on the present strain of bacteria, but they have low level antibodies EGC SAgs. It can be concluded, that carriers of *S. aureus*, don't induce antibody response against EGC SAgs [4, 19, 62]. In addition, bacteraemia enhances the potency of the anti-EGC SAgs, which are only rarely formed in patients with bacteraemia [53, 64]. Other researchers have reported that low levels of non-EGC antibodies, detectable *in vivo*, do not indicate bacteraemia [53, 56, 64], table I.

Table I
The risk coefficient of *S. aureus* carriage

Adults	*S. aureus* carriage rate
Adults receiving insulin	(34.0–53.4%)
Adults healthy	(10.7–34.2%)
Diabetics receiving oral anti-diabetic agents	(11.0–35.0%)

Reference: [56]

Clinical studies

Carriers of *S. aureus* have diverse characteristics, depending on ethnicity, race, gender and age. Colonization of *S. aureus* may predispose to staphylococcal carriage. Lipsky et al. investigated several factors that may be associated with the staphylococcal carriage comparing diabetic out-patients with non-diabetic control group. The number of *S. aureus* carriers of the nasal cavity and on the skin noticed in 59 diabetic patients was significantly higher (30.5%) compared to 44 in the control group (11.4%) ($p = 0.02$), but the ratio did not significantly differ between insulin-dependent diabetic patients (31.0%) and non-insulin-dependent diabetic patients (30.0%). No correlation ($p > 0.05$) with antibiotic treatment, age, race or clinical condition was observed in diabetic patients who were carriers of staphylococcus. In contrast, an inverse correlation to the glucose concentration (based on fasting plasma glucose and glycosylated hemoglobin) was found in hospitalized patients ($p < 0.03$). Additionally, during the 1-year follow-up staphylococcal colonization appeared more often in diabetic patients than in the control group. The results confirm the increased incidence of staphylococcus colonization in patients with diabetes compared to non-diabetic patients, and disclose that insulin and other demographic factors do not affect the higher rates of *S. aureus* carriage in the diabetic patients' nasal cavities [28] (table II).

Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) colonizes the front nose in diabetic patients which may cause an increase in morbidity and mortality. Alizargar et al. collected anterior nares swabs from 494 patients with diabetes. Out of the 494 patients, 210 (42.5%) had a positive result of nasal colonization by *S. aureus*, out of which 122 (57%) were MRSA (24.7% of all patients

Table II
The frequency of isolation *Staphylococcus aureus* in patients with diabetes

Clinically diagnosis	The most commonly isolated microorganism	Frequency isolation	References
Acute purulent meningitis (APM)	*Staphylococcus aureus*	31%	67
Sepsis	*Staphylococcus aureus*	21.3%	67
Bacteraemia	*Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*	23.9%	54
Diabetic foot syndrome (DFS)	*Staphylococcus aureus*	15.6%	33
Skin and soft tissue infections (SSTI)	MRSA MSSA	7.4% 13.2%	36
Carriers of the nasal cavity and on the skin	*Staphylococcus aureus*	30.5%	32

with DM). The study showed a high incidence of MRSA infections in diabetic patients, which leads to the conclusion that epidemiological studies and assessment of MRSA colonization risk factors may be helpful in the effective monitoring of patients with diabetes [1]. *S. aureus* as a source of endogenous microflora is a common factor for surgical site infection (SSI) after major heart surgery (MHS). All patients undergoing MHS must have their microbial flora in the nasal cavity tested. Every year brings new observational studies evaluating the effect of staphylococcal carriage on the development of SSI after MHS. Among others, Muñoz P. et al. conducted annual observational studies in which patients undergoing MHS were examined for nasal *S. aureus* transport prior to surgery. Of the 357 patients studied, 96 (27%) were carriers of *S. aureus* in the nasal cavity, of which 9 (9.4%) had strains of MRSA. The results have shown that the independent predictor of the development of SSI was the presence of *S. aureus* in the nasal cavity, which, for patients with diabetes, was RR: 5.9, p = 0.003. The results confirm that the carriage of *S. aureus* in the nasal cavity increases the frequency of hospital SSI after major heart surgery MHS [35].

McKane et al. have analyzed intensive care unit (ICU) patients who were positive with methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (N = 76 913 patients). MRSA colonization on admission was associated with earlier exposure to pathogens while providing healthcare services. The researchers mark out: the time prior to the hospitalization (OR = 2.4 95% – CI = 1.3 – 4.7; p < 0.01), a stay in a nursing home (OR = 3.8 95% – CI = 2.3 – 6.3; p < 0.01) and contact with the health care system (OR = – Cl 8.0 95% = 4.2–15.1; p < 0.01). Among the comorbidities associated with MRSA colonization, diabetes has also been mentioned (p < 0.01). The risk factor associated with the adoption of ICU, did not demonstrate a statistically significant connection with MRSA colonization (OR = 1.1 95% – CI = 0.6–1.8; p = 0.87). The study shows that the use of screening is helpful in defining risk groups which are exposed to MRSA colonization [32] (table III).

Table III
Meta-analysis of risk factors associated with MRSA colonization and admission to the ICU and the hospital

Comorbid conditions	Odds Ratio hospital	Odds Ratio ICU	p-value hospital	p-value ICU
Diabetes mellitus	2.30	3.78	< 0.01	< 0.01

ICU – intensive care unit; Reference: [32]

3. Staphylococcal infections in patients with diabetes

3.1. Staphylococcal superantigens

Virulence factors produced by *S. aureus* include enzymes, toxins and cell surface proteins. Several enzymes produced by *S. aureus* cause tissue destruction and the spread of toxins. Toxins cause cytolysis and tissue damage, e.g. the presence of enterotoxins and exotoxins may cause septic shock syndrome. Superantigens are made of structurally and functionally related molecules which include TSST-1 and enterotoxin [12].

Currently there are 24 serologically different superantigens: TSST-1, Staphylococcal enterotoxins (SES) (serotypes A, Bn, Cn, D, E and G) and SE-like (SE-I) superantigen (serovars H, I, and JX). TSST-1 and SE-X have different amino acid sequence. These superantigens have one seat with a low-affinity major histocompatibility complex class II (MHC-II) which binds to the folds O/B. The location interacts with the α-chains of MHC II molecules. Binding to MHC II superantigen TSST-1 interacts also with an antigenic peptide which is a peptide-binding groove of the molecule. The β chain of T-cell receptors (Vβ-TCRs) binding site of TSST-1 is located in a groove between the O/B fold and β-grasp domains [58, 65].

3.2. Skin and soft tissue infections

Skin and soft tissue infections (SSTI) can cause substantial morbidity in diabetes [29]. Skin lesions occur in 20–30% of patients with diabetes and metabolic disorders and patients with abnormal sweating, itching, hyperalgesia [55].

Cultures of *S. aureus* clones USA 100 can be often found on the skin and in the front of the nostrils. This may indicate the origin of endogenous USA 100. Patients with diabetes are heavily colonized with *S. aureus* clones USA 100 , in large amount over 10^{13}/person [66]. Exacerbation of symptoms on the skin may occur as a result of staphylococcal infections. For the same reason, there is a disorder in immune response that occurs as a result of the presence of allergens and viruses. Abnormal body response is caused by superantigens and alpha-toxins that can cause skin inflammation [58].

Clinical studies

Lipsky et al. collected data from clinical studies of 3030 patients with diabetes hospitalized with positive bacterial cultures and diagnosed with SSTI. The data were collected from 97 hospitals in between 2003–2007. The results of swabs taken from wounds revealed mixed cultures in 53.0% of cases of infection at different localization and in 58.7% of cases of foot infections. Patients with foot infections com-

pared with patients with infections of other localization were positive for MRSA (9.6% vs 7.4%, $p = 0.06$) and methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) (16.4% vs 13.2%, $p < 0.05$), respectively. During the study period, the percentage of MRSA positive swab results in patients with infections at different localizations increased from 14.0% to 24.6%, $p = 0.006$, and from 11.6% to 21.9%, $p < 0.0001$ for patients with foot infections, respectively [29].

3.3. Diabetic foot syndrome

Diabetic foot syndrome (DFS) is one of the most common causes of lower extremity amputation in developed countries [31]. DFS is defined as ulcer or destruction of deep tissues of the foot in patients with diabetes, with the presence of neurological disorders and peripheral vascular disease of the lower limbs at different levels. Pathological changes can be found in all of its structural elements: vessels (atherosclerosis and hardening of the walls), nerves (neuropathy), skin (inflammation, loss of the elasticity, trophic changes, calluses, ulcers), muscles (atrophy, contractures) and bones (local osteoporosis, osteomyelitis, avascular necrosis) [55]. Diabetic foot ulcers (DFU) is a complication that occurs in diabetes. DFU poses a risk of further infection, gangrene and in the end, limb amputation. The most frequently mentioned risk factors for DFU include ischemia, neuropathy and ischemia, abnormal neuroischemia. Studies have shown that only 10% of patients develop DFU that is not complicated by ischemia or neuropathy, and 90% of them develop abnormal neuroischemia, neuropathy and ischemia [69]. SAgs cause activation of TCR-Vβ region present on T-cells. Activated T-cells stimulate the production of proinflammatory cytokines and maintain the chronic inflammation. The consequence of the presence of SAgs is the complication in the wound healing. Vu et al. examined the patients with DFU from whom *S. aureus* strains USA100 were isolated. This group of clones revealed increased production of sags that may interfere with the growth of bacterial cells' culture, and as a consequence impair the wound healing. Vu et al. showed that 88% of the strains isolated from patients with DFU had a SEI-X gene, which contains the gene for TSST-1. Typically, *S. aureus* strains have the gene for either SEl-X or TSST-1. Sel-x was located in the core chromosome of all *S. aureus* strains except for USA200 strains, which encode TSST-1 within pathogenicity islands. Researchers suggested that the therapy neutralizing or reducing SAg production by *S. aureus* may be beneficial in the management of patients with DFU. The significant virulence factor in the skin infections is *S. aureus*' α-toxin. The toxin synergizes with SAgs in some disease conditions. Researchers evaluated α-toxin production among the DFU isolates and reported that USA300 isolates had the highest of this toxin production [66].

Clinical studies

According to the definition, DFS pertains to infection, ulceration, or destruction of the foot's deep tissues, resulting from the injury of peripheral nerves or blood vessels. Depending on etiology, DFS is divided into neuropathic, ischemic, or mixed type. Małecki et al. conducted a study to determine the most common pathogens responsible for infections associated with DFS. Medical records of patients treated in clinical hospital between 2008 and 2010 were collected. A total of 102 patients have been identified, from whom samples were taken and tested for antibiotics sensitivity. 199 bacterial strains were isolated, in total. Majority of them were gram-positive bacteria, especially *S. aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus* and *Enterococcus faecalis*. High percentage of infections was caused by *S. aureus* (15.58%). However, out of all the etiological factors *Staphylococcus* spp. was 26.63%, which in particular consists of coagulase-positive *S. aureus* isolated in most cases of DFU [31]. The study suggests that *Staphylococcus* spp. predominates among the etiological factors of DFS infection and the appropriate patient education that encourage regular foot care in order to prevent DFS and its complications should be conducted.

Chronic infections caused by *S. aureus* generate resistance to antibiotics. The presence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) may cause the formation of small colony variants (SCVs). Cervantes-Garcia et al. have reported isolation of MRSA strains in patients with DFU, where 36% of cases contained genes *mecA* [6]. Cervantes-Garcia et al. described the first cases of patients with type 2 diabetes who had diabetic foot infections caused by MRSA-SCV, and the DFU not treated with gentamicin. *S. aureus*-SCV is localized intracellularly, which may interfere with the use of antibiotics. The authors report that SCV isolates were present in patients with long-term treatment with antibiotics or DFU infection lasting for a long time. *S. aureus*-SCVs strains are responsible for the misidentification of infections in patients by routine. Automated systems are used to detect *S. aureus* isolates. Mistakes can be the consequence of short incubation periods or low discrimination levels in data bases. The key to a proper *S. aureus*-SCVs recognition and successful recovery is the use of an extensive set of cultures and identification techniques [6]. This study makes these isolates an important outcome because SCV variants had neither been previously reported nor identified with DFU infections. The isolation of MRSA-SCVs in diabetic foot ulcers and patients diagnosed with type 2 diabetes mellitus indicates that

the treatment is more complex. The use of adequate antibiotics is especially important in order to avoid antibiotic resistance [6].

3.4. Sepsis

S. aureus infections are the second leading cause of sepsis in the USA [21]**.** Infections in diabetic patients can be severe and life-threatening because the clinical signs are often masked by the chronic complications of diabetes, which leads to the delayed medical diagnosis. What contributes more to this condition, is the inability to control the infection caused by the mutual dependence and defect in immune cell and in the humoral response [41]. Sepsis is a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) resulting from the infection. SIRS is characterized by a sudden onset of at least two of these symptoms, body temperature above 38°C or below 36°C, heart rate greater than 90/minute, respiratory rate greater than 20/minute or $PaCO_2$ below 32 mmHg, the number of leukocytes more than 12 000/μl or less than 4 000/μl, or more than 10% of the immature form of neutrophils [25]. Infectious diseases caused by *S. aureus* cause some of the most severe hospital-associated and community-acquired illnesses. Staphylococcal superantigens (SAgs) secrete staphylococcal toxins that are major *S. aureus* virulence factors. SAgs mediate many clinical signs such as fever, hypotension, multi-organ dysfunction and rash. SA-gs are also capable of enhancing the toxic effects of endogenous endotoxin. SAgs are associated with many life threatening *S. aureus* illnesses such as TSS, septicemia. SAgs cross-link the Vb chain of the T-cell receptor (TCR) to the MHC II molecule on antigen-presenting cells independent of cognate antigen specifity, inducing a powerful activation of T-cells and macrophages with massive production of cytokines. Activation of 0.0001–0.001% of the body's T-cell population is the normal response to the antigen, but SAgs can activate 20–30% of T-cells and in some cases up to 70% of the total T-cell population. The number of activated T-cells and macrophages secreting large quantities of cytokines, is responsible for the clinical symptoms associated with SAgs and staphylococcal toxic shock syndrome (TSS), such as capillary leak, hypotension, rash, and fever. Researchers' observations provide evidence, that SAgs mediated in inhibiting antibody response [21, 25]. T-cell exhaustion is the most common explanation used to account for T-cell answer during TSS. T-cell exhaustion in humans with TSS has not been observed. B-cell function, including activation state (lack of T-cell help), chemotaxis and migration could be affected during TSS which would therefore inhibit the development of SAgs and *S. aureus*-specific antibodies, and memory response [24]. In patients with staphylococcal pneumonia and infective endocarditis sepsis state is a consequence of staphylococcal infection. The significant number of patients develop sepsis after surgery and systemic effects in these patients may result from the superantigen action. Infectious strains are likely to produce the toxins and certain superantigens, notably SEA, TSST-1, and SEC, which are overrepresented in sepsis cases. Superantigens may be produced in focal sites of infection protected from hemoglobin peptides and then secreted into the bloodstream [58].

Clinical studies

Petrovici et al. conducted studies assessing etiology, clinical features and results of diabetic patients with invasive disease. A retrospective study was conducted in the period from 2008 to 2010, in the Clinical Infectious Diseases Hospital of Iasi, Romania. The study included 75 diabetic patients with sepsis with proven microbial etiology (positive cultures from normally sterile sites) and patients with sepsis with clinical symptoms of the suspected etiology (positive cultures from the pus). Among the 75 diabetic patients with severe cases of sepsis (44%) there were more cases of patients with insulin-dependent diabetes than with non-insulin-dependent diabetes (40% vs. 4%, $p < 0.005$). The most common isolated agents were *S. aureus* and *Escherichia coli*, which were found in 16 (21.3%) cases out of both species, the next was coagulase negative staphylococci (66%). Multiple septic disseminations were in 17 (22.6%) cases and meningeal involvement was documented in 10 (15.6%) cases. MRSA was reported in 53.3% cases of the invasive strains of *S. aureus* [41]. These results confirm that patients with diabetes are particularly exposed to staphylococcal superantigens (TSST-1, SEC and SEA), which in favorable conditions cause sepsis [41]. Targeted treatment should be focused on the staphylococcal virulence factors.

S. aureus bacteraemia (SAB) can lead to endovascular and metastatic infections, and complications can occur at almost all sites of the body. Increased morbidity and mortality in people with SAB is determined by the presence of adhesins and toxins despite the appropriate antimicrobial treatment. These factors behave like superantigens (SAgs) and lead to a massive release of proinflammatory cytokines. The result of these changes is inflammatory response, which leads to endothelial leakage, hemodynamic shock, multiorgan failure, and in the end to death [36]. Vandenesch et al. investigated the relationship between PVL and CA-MRSA infections. CA-MRSA isolates that were collected from all over the world very often contained PVL [62]. Risk factor for MRSA infection is usually the nasal cavity colonization. It was found that 82% of patients with bacteraemia caused by MRSA had previously strains of *Staphylococcus* existing in the nasal

cavity [15]. Risk factors for infection HA-MRSA relate to prior hospitalization, antibiotics, surgery and the presence of prosthetic or other implant devices. Other comorbidities (diabetes, cancer), colonization of the nasal cavity and prosthetic devices are the most common causes of CA-SAB [53].

Patients with diabetes are at the increased risk of colonization of *S. aureus*, which is connected with the frequent infections of the skin, soft tissue, and sepsis. Stoeckle et al. conducted retrospective studies on 71 patients with diabetes and 252 without diabetes, who have been infected through the bloodstream. The majority of microorganisms isolated from the blood cultures of the above mentioned groups of patients with diabetes were: *E. coli* (28.2% versus 37.3%, p = 0.156) and *S. aureus* (23.9% vs. 15.9%, p = 0.117). Bloodstream infections (BSI) in diabetic patients (25.8 episodes/1000 admissions), and in patients without diabetes (5.8 episodes/1000 admissions) was reported. The incidence of BSI was 4.4 times higher in diabetic patients than in non-diabetic patients (< 0.0001). Moreover, bacteraemia occurred 2.3 times more frequently in patients with diabetes than in patients without diabetes. Research conducted by Stoeckle et al. led to the conclusion that patients with diabetes are at the increased risk of BSI and complications of infection [60].

Hernandez et al. collected data on episodes of community onset bacteraemia of unknown origin (CO-BSI) at the university hospital between 2005 and 2011. Incidents of CO-BSI were reported in 745 patients. The most frequent comorbidity noticed was diabetes mellitus in 151 (20.3%) patients [18] (table IV).

Table IV
Isolated microorganisms and antibiotic susceptibility in community-onset bacteraemia of unknown origin

Microorganisms	Total n = 745 (%)	CA-BSI n = 340 (%)	HCA-BSI n = 405 (%)	p-value
Methicillin-sensitive *S. aureus*	64 (8.6)	35 (10.3)	29 (7.2)	< 0.128
Methicillin-resistance *S. aureus*	14 (1.9)	5 (1.5)	9 (2.2)	< 0.452

CA-BSI – community acquired bloodstream infections
HCA-BSI – health care associated bloodstream infections
Reference: [18]

S. aureus was one of the risk factors for CO-BSI. In multivariate analysis with regard to *S. aureus*, the odds ratio for diabetes was OR 1.72 (1.01–2.91). *S. aureus* (including methicillin-resistant strains) was equally isolated both in patients with health-care-associated (HCA-BSI) and community-acquired (CA-BSI) bloodstream infections. It should be noted that 17.9% of *S. aureus* strains were resistant to methicillin. The results obtained by Hernandez et al. led to the conclusion that knowledge of the pathogenic bacteria responsible for CA-BSI is important in the selection of appropriate therapy, especially for *S. aureus*, which is an independent predictor of mortality [18], table V.

Table V
Univariate analysis of predictors of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in patients with community-onset bacteraemia of unknown origin

Risk faktor: *S. aureus*	No n = 667 (%)	Yes n = 78 (%)	p-value
HCA-BSI	367 (55.0)	38 (48.7)	0.290
Prior hospital admission	187 (28.0)	16 (20.5)	0.158
Comorbility Diabetes mellitus	127 (19.0)	24 (30.8)	0.015

Reference: [18]

Laupland et al. conducted the study on the population in Canada, which refers to about one million adults with severe bloodstream infection in the period 2000–2002. 342 residents met the criteria for severe bloodstream infections (BSI), while the total annual incidence was 15.7 per 100.000 people. Significant risk factors for bloodstream infections were related to several demographic conditions and chronic diseases like diabetes mellitus (relative risk RR 5.9, 4.4, –7.8). The most common etiological factors were *S. aureus*, *E. coli*, and *Streptococcus pneumoniae*, respectively: 3.0, 3.0 and 1.9 per 100.000. Diabetes was the risk factor for BSI in 63 patients, whose estimated risk of exposure to infection of the bloodstream was 80.73. The incidence of serious bloodstream infections in patients with diabetes, compared to patients without diabetes was 78 per 100.000. The etiological factor for severe infections of the bloodstream was *S. aureus* in 46 patients and hospital infection occurred in 19 patients. Laupland et al. showed that epidemiological knowledge of the BSI, especially in high- risk patients, which include patients with diabetes, is important to ensure proper healthcare and take the precautions [26]. McKane et al. hypothesized that diabetes can correlate with an increased risk of CA-BSI. 2551 patients in critical condition were admitted to the ICU, where the incidence of CA-BSI in patients with diabetes accounted for 13.6%. 63% out of the the 2551 ICU patients had diabetes. The most common microorganisms isolated from the test group were: *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecium*. The researchers found that diabetes is a predictor of CA-BSI. The risk of the blood infection was significantly higher in patients with diabetes (adjusted odds ratio 1.42) compared to

patients without diabetes. In addition, adjusted risk of sepsis was significantly higher in patients with diabetes (1.26) compared to patients without diabetes. McKane et al. reported that diagnosed diabetes and glycated hemoglobin (HbA1c) levels greater than 6.5% are independent predictors of CA-BSI in ICU patients. All that information confirm that diagnosed diabetes and chronic hyperglycemia increase the risk of infection [32], table VI.

Table VI
The frequency of bloodstream infection in patient with diabetes mellitus

BSI	Concomitant diabetes mellitus	References
Community onset bacteraemia of unknown origin (CO-BSI)	20.3%	56
Healthcare-associated bloodstream infection (HCA-BSI)	18.2%	61
Community-acquired bloodstream infections (CA-BSI)	13.6%	35

A retrospective cohort study using administrative data was carried out in 1999 in Canada. A group of diabetic patients was compared to a group of non-diabetic patients (n = 513.749 in each group). Risk ratios were calculated for infectious diseases and death caused by the outbreak of infectious diseases, for people with and without diabetes. The study was repeated to confirm the stability of the predictions for the similarly defined second group, using data from 1996. The risk factor for infectious diseases and death due to the infectious disease for patients with diabetes compared to patients without diabetes was 1.21 (99% CI 1.20–1.22). In contrast, the risk ratio was 2.17 for infectious diseases, and 1.92 for the death due to the infection. Many individual infections occurred more frequently in patients with diabetes, particularly severe bacterial infections. The results obtained from the studies lead to the conclusion that diabetes is a risk factor for increased morbidity and mortality due to the infectious diseases, and micro- or macrovascular complications. In addition, the infection as a complication of diabetes should be also considered [52].

3.5. Infective endocarditis

The etiological agent of the infective endocarditis (IE) is *S. aureus* and accounts for about 40 000 cases/year in the USA [21]. Infective endocarditis is the heart endothelial cells' infection caused by different bacterial species. This life-threatening infection is usually caused by *S. aureus*.

The changes that can be observed is the presence of the large growing vegetation on the heart endothelium. These include host components (tissue factor, fibronectin and fibrinogen), host cells, and bacteria [33]. The formation of the growing vegetations is dependent on the cell surface, which adhere to *S. aureus* virulence factors. Pragman et al. showed that TSS toxin-1 (TSST-1) plays an important role in initiating the infective endocarditis that is caused by the strains which produce superantigens. [15].

Xiong et al., published that in patients with infective endocarditis persistent bacteremia strains type USA200 (producing exotoxins: TSST-1, SEC and α-toxin) were isolated, which carry the tstH gene that encodes TSST-1 [68]. Correlation between the presence of tstH and TSST-1 protein production is 1:1 and about 90% of infective endocarditis cases are associated with USA 200 strains and TSST-1 production [20]. Mattis et al. showed that superantigen staphylococcal enterotoxin (SE) C is also highly important in the infective endocarditis. Huseby et al. showed that secreted cytolysins' β-toxin contribute to the infective endocarditis progression [20]. Researchers' reports confirm increased incidence of staphylococcal colonization in diabetic patients compared to patients without diabetes. However, they still do not know the critical factors responsible for the higher rates of carriage of *S. aureus* in the nasal cavity and the need to control the increasing antibiotics' resistance in hospital settings is constantly growing. In other studies MRSA MW2 (an SEC-producing strain) encoding multiple Sags were used, including SEC and SEl-X. MW2 and its derivatives that were lacking sec or selx were tested on the rabbit model of IE and sepsis. This study demonstrated that SEC is the dominant virulence SAg in strain MW2, and *S. aureus* bacteraemia when alone, does not account for the lethal outcome in infection but the virulence SAg exhibits high mortality [50].

An international study on *S. aureus* strains isolated from patients with infective endocarditis revealed higher frequency of SAg genes encoding TSST-1, SEC, SEG, and SEI among IE isolates compared to isolates collected from soft tissue infections [38]. Sepsis and IE are serious infections of the blood and heart valves. *S. aureus* strains that are exceptional at causing IE in rabbits produce TSST-1, SEB, and/or SEC [59]. Furthermore, we have previously shown that SAg-deficient strains, when expressing TSST-1 ectopically, increased ability to generate septic vegetations compared to TSST-1-negative isogenic strains [45]. These results highlight the critical role of SAgs in IE and explain the high prevalence of these genes in IE patients' strains.

Lee et al. showed the association between SAg-in duced vascular leakage and TSS. IE with *S. aureus* bacteraemia develops on infection sites in susceptible

individuals which produce SAgs and can lead to hypotension and cause a systemic buildup of SAg. In studies Lee et al. rabbits were treated with TSST-1. This animal model showed that reducing vegetation size and bacterial burden in infected rabbits will be possible by avoiding SAg-induced changes that increase difficulty in IE management. Obtained data suggest that SAgs'effects are vascular leakage, hypotension and immune system dysregulation, which could interfere with the cardiovascular system in the end [27]. All the defence factors protecting from the IE development depend on therapeutic agents that neutralize SAgs.

3.6. Acute purulent meningitis

Acute purulent meningitis (APM) is rapidly progressive bacterial infection of the meninges and subarachnoid space. APM's beginning is sudden and it's course dynamic and dominated by meningeal signs and increased intracranial pressure. Severe status within a few hours is deteriorating and can reach up to life-threatening. APM is characterized by a large number of inflammatory CSF cells, majority of which are neutrophils. Untreated APM spreads to the nervous tissue of the brain, leading to the meninges and brain inflammation. The patient's condition is usually serious. The major APM symptoms include: headache, fever above 39°C, nausea, vomiting, photophobia and meningeal signs [42, 47].

Clinical studies

Petrovici et al. analysed such factors like: etiology, clinical symptoms and the results in patients with diabetes and bacterial meningitis, the determination of the nervous system during invasive [42]. In a three-year-retrospective study, 445 adults at the age of over 18 years with a diagnosis of APM (positive cultures from normally sterile sites) or suspected APM (positive cultures from pus) were examined. The studied group was divided into 2 subgroups: diabetic patients (95 out of 445) and non-diabetic patients (350 out of 445). APM was diagnosed in 16 out of 95 patients with diabetes (16.8%) and in 43 out of 350 (12.3%) patients without diabetes ($p = 0.322$). Positive cultures were isolated simultaneously from CSF and other fluids (blood and pus). The most frequent clinical symptoms observed in patients with diabetes and without diabetes were consciousness disorders (68.8% vs. 23.3%) and fever (37.5% vs 88.4%). *S. aureus* was the most common etiological agent in meningitis both in patients with diabetes and without diabetes (31.3 vs. 23.3%). This study shows a relatively high frequency of meningitis episodes in diabetic patients in sepsis. Bacterial meningitis was often microbiologically validated in the CSF in the group of diabetic patients. Petrovici et al. report in this study that the risk of the delayed bacterial meningitis diagnosis was unfortunately high due to the chronic complications of diabetes [42].

4. Vaccination

Salgado-Pabón et al. were searching for an effective *S. aureus* vaccine. A vaccination with purified SAgs or SAg toxoids alone or in combination with cytotoxins has proven to be a successful strategy to protect rabbits against lethal doses of *S. aureus* clonal types (USA100, USA200, USA300, USA400). This vaccination provides sterilizing immunity. Protection of rabbits after contact with CA-MRSA TSST1+ USA200, SEC+ USA400 or SEB+ USA400 strains, provides vaccination with TSST1, SEC or SEB, respectively [51].

TSS1-neutralizing antibodies production is stimulated by three different immunizing TSST1 toxoids. TSS1- antibodies protect rabbits from a TSST1 lethal challenge in an LPS enhancement model. In the rabbit pneumonia model exposed to *S. aureus* MNPE (TSST1+, SEC+ and α-toxinHI) trivalent vaccine which is composed of TSST1G31S (or TSST1S32P), SEC and α-toxinH35L provides complete protection against this lethal challenge. It protects rabbits from infective endocarditis and lethal sepsis providing pentavalent vaccine which contains TSST1G31S (or TSST1S32P), SEC, α-toxinH35L, β-toxin and γ-toxin when treated with a lethal dose of *S. aureus* MNPE [51].

Salgado-Pabón et al. report that multivalent vaccines directed against virulence factors produced by staphylococci are to protect from dangerous diseases caused by *S. aureus*. Studies show that neutralization of superantigens and cytolysins causes inactivation of *S. aureus*. The same will be for coagulase-negative staphylococci, when we remove an alternative way of complement and neutrophils opsonization. Vaccination strategies must be based on understanding *S. aureus* infection pathogenesis and using animal models with immune system and cardiovascular physiology that resemble the human ones [51].

5. Conclusions

1. The elevated glucose levels in diabetic patients with increased dynamics of the infection result in the difficulty to control the infection properly.
2. The dynamics of colonization of the nasal vestibule by *S. aureus* connected with high risk of infection diabetic patient. Among *S. aureus* virulence factors, superantigens (SAgs) are essential for pathogenicity.
3. The role that superantigens play in causing infectious diseases in immunodeficient patients must

be highlighted. An appropriate vaccine with multiple toxoids may provide protection against *S. aureus* infection in patients with diabetes.

References

1. Alizargar J., Sharif M.R., Sharif A.: Risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in diabetic outpatients, a prospective cohort study. *Int. J. Microbiol. Res.* **4**, 147–151 (2013)
2. Alonzo F., Torres V.J.: The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **78**, 199–230 (2014)
3. Badaru A., Pihoker C.: Type 2 diabetes in childhood: clinical characteristics and role of β-cell autoimmunity. *Curr. Diab. Rep*. **12**, 75–81 (2012)
4. Burian M., Grumann D., Holtfreter S., Wolz C., Goerke C., Bröker B.M.: Expression of staphylococcal superantigens during nasal colonization is not sufficient to induce a systemic neutralizing antibody response in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. **31**, 251–256 (2012)
5. Casqueiro J., Casqueiro J., Alves C.: Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J. Endocrinol. Metab*. **16**, 27–36 (2012)
6. Cervantes-García E., García-Gonzalez R., Reyes-Torres A., Resendiz-Albor A.A., Salazar-Schettino P.M.: *Staphylococcus aureus* small colony variants in diabetic foot infections. *Diabet. Foot Ankle*, **6**, 26431 (2015)
7. Dai X., Zhan J., Demmy T.A., Poordad F.B., Fauceglia P.L., Zhang H., Wu L.: Monocytes play different roles in stimulating T cells in obese diabetic individuals. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **28**, 374–383 (2015)
8. De Bus L., Coessens G., Boelens J., Claeys G., Decruyenaere J., Depuydt P.: Microbial etiology and antimicrobial resistance in healthcare-associated versus community-acquired and hospital-acquired bloodstream infection in a tertiary care hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. **77**, 341–345 (2013)
9. DeFuria J., Belkina A.C., Jagannathan-Bogdan M., Snyder-Cappione J., Carr J.D., Nersesova Y.R., Markham D., Strissel K.J., Watkins A.A., Zhu M., Allen J., Bouchard J., Toraldo G., Jasuja R., Obin M.S., McDonnell M.E., Apovian C., Denis G.V., Nikolajczyk B.S.: B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5133–5138 (2013)
10. Dumont A.L., Nygaard T.K., Watkins R.L., Smith A., Kozhaya L., Kreiswirth B.N., Shopsin B., Unutmaz D., Voyich J.M., Torres V.J.: Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **79**, 814–825 (2011)
11. Fast D.J., Schlievert P.M., Nelson R.D.: Nonpurulent response to toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus*. Relationship to toxin-stimulated production of tumor Necrosis factor. *J. Immunol*. **140**, 949–853 (1988)
12. Fijałkowski K., Czernomysy-Furowicz G., Ferlas M.: *Staphylococcus aureus* versus the immune system. *Post. Mikrobiol.* **47**, 497–501 (2008)
13. Frasca D., Ferracci F., Diaz A., Romero M., Lechner S., Blomberg B.B.: Obesity decreases B cell responses in young and elderly individuals. *Obesity* (*Silver Spring*), 24 615–625 (2016)
14. Fraser J.D., Proft T.: The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol. Rev.* **225**, 226–243 (2008)
15. Gillet Y., Etienne J. i wsp.: Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, **359**, 753–759 (2002)
16. Gravet, A., Colin D.A., Keller D., Girardot R., Monteil H., Prévost G.: Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett*. **436**, 202–208 (1998)
17. Guha M., Bai W., Nadler J.L., Natarajan R.: Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem*. **275**, 17728–17739 (2000)
18. Hernandez C., Cobos-Trigueros N., Feher C., Morata L., De La Calle C., Marco F., Almela M., Soriano A., Mensa J., Del Rio A., Martinez J.A.: Community-onset bacteraemia of unknown origin: clinical characteristics, epidemiology and outcome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. **33**, 1973–1980 (2014)
19. Holtfreter S., Bauer K., Thomas D., Feig C., Lorenz V., Roschack K., Friebe E., Selleng K., Lövenich S., Greve T., Greinacher A., Panzig B., Engelmann S., Lina G., Bröker B.M.: egc-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect. Immun.* **72**, 4061–4071 (2004)
20. Huseby M.J., Kruse A.C., Digre J., Kohler P.L., Vocke J.A., Mann E.E., Bayles K.W., Bohach G.A., Schlievert P.M., Ohlendorf D.H., Earhart C.A.: Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14407–14412 (2010)
21. Klein E., Smith D.L., Laxminarayan R.: Hospitalizations and deaths caused by methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerg. Infect. Dis*. **13**, (2007)
22. Klekotka R.B., Mizgała E., Król W.: The etiology of lower respiratory tract infections in people with diabetes. *Pneumonol. Alergol. Pol*. **83**, 401–408 (2015)
23. Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H.: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev*. **10**, 505–520 (1997)
24. Kulhankova K., King J., Salgado-Pabón W.: Staphylococcal toxic shock syndrome: superantigen-mediated enhancement of endotoxin shock and adaptive immune suppression. *Immunol. Res*. **59**, 182–187 (2014)
25. Kübler A., Jaeschke R., Jankowski M.: Sepsis and septic shock. In Szczeklik A. (ed), Internal Diseases. The state of knowledge on year 2010. *Practical Medicine*, Kraków, s. 2200–2205 (2010)
26. Laupland K.B., Gregson D.B., Zygun D.A., Doig C.J., Mortis G., Church D.L.: Severe bloodstream infections: a population-based assessment. *Crit. Care Med*. **32**, 992–997 (2004)
27. Lee P.K., Deringer J.R., Kreiswirth B.N., Novick R.P., Schlievert P.M.: Fluid replacement protection of rabbits challenged subcutaneous with toxic shock syndrome toxins. *Infect. Immun*. **59**, 879–884 (1991)
28. Lipsky B.A., Pecoraro R.E., Chen M.S., Koepsell T.D.: Factors affecting staphylococcal colonization among NIDDM outpatients. *Diabetes Care*, **10**, 483–486 (1987)
29. Lipsky B.A., Tabak Y.P., Johannes R.S., Vo L., Hyde L., Weigelt J.A.: Skin and soft tissue infections in hospitalized patients with diabetes: Culture isolates and risk factors associated with mortality, length of stay and cost. *Diabetologia*, **53**, 914–923 (2010)
30. Lydyard P.M., Whelan A., Fanger M.W.: Short lectures. Immunology, Scientific Publishing *PWN SA*, Warszawa, s. 97–103 (2008)

31. Małecki R., Rosiński K., Adamiec R.: Etiological factors of infections in diabetic foot syndrome – attempt to define optimal empirical therapy. *Adv. Clin. Exp. Med*. **23**, 39–48 (2014)
32. McKane C.K., Marmarelis M., Mendu M.L., Moromizato T., Gibbons F.K., Christopher K.B.: Diabetes mellitus and community-acquired bloodstream infections in the critically ill. *J. Crit. Care*. **29**, 70–76 (2014)
33. Miro J.M., Fowler V.G. i wsp.: *Staphylococcus aureus* native valve infective endocarditis: report of 566 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clin. Infect. Dis*. **41**, 507–514 (2005)
34. Mueller E.A., Merriman J.A., Schlievert P.M.: Toxic Shock Syndrome Toxin-1, Not Alpha Toxin, Mediated Bundaberg Fatalities. *Microbiology*, **161**, 2361–2368 (2015)
35. Muñoz P., Hortal J., Giannella M., Barrio J.M., Rodríguez--Créixems M., Pérez M.J., Rincón C., Bouza E.: Nasal carriage of *S. aureus* increases the risk of surgical site infection after major heart surgery. *J. Hosp. Infect*. **68**, 25–31 (2008)
36. Naber C.K.: *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clin. Infect. Dis*. **48**, 231–237 (2009)
37. Nada H.A., Gomaab N.I.M., Elakhrasa A., Wasfya R., Bakera A.: Skin colonization by superantigen-producing *Staphylococcus aureus* in Egyptian patients with atopic dermatitis and its relation to disease severity and serum interleukin-4 level. *Int. J. Infect. Dis*. **16**, 29–33 (2012)
38. Nienaber J.J., Sharma Kuinkel B.K., Clarke-Pearson M., Lamlertthon S., Park L., Rude T.H., Barriere S., Woods C.W., Chu V.H., Marín M., Bukovski S., Garcia P., Corey G.R., Korman T., Doco-Lecompte T., Murdoch D.R., Reller L.B, Fowler V.G.: Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. *J. Infect. Dis*. **204**, 704–713 (2011)
39. Olokoba A.B., Obateru O.A., Olokoba L.B.: Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med. J*. **27**, 269–273 (2012)
40. Panton P.N., Valentine F.C.O.: Staphylococcal toxin. *Lancet*, **219**, 506–508 (1932)
41. Petrovici C.G., Dorobăt C., Bejan C., Juganariu G., Simiraş E., Filip O., Luca V., Miftode E.: Epidemiology and clinical features in diabetic patients with invasive infections treated at the Clinical Hospital of Infectious Diseases of Iaşi, Romania, between 2008–2010. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* **115**, 1035–1041 (2011)
42. Petrovici C.G., Leca D., Teodor A., Dorneanu O., Juganariu G., Dorobăt C., Egidia M.: Bacterial meningitis during sepsis in diabetic patient. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*. **117**, 901–907 (2013)
43. Piya M.K., McTernan P.G., Kumar S.: Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J. Endocrinol*. **216**, T1-T15 (2013)
44. Poindexter N.J., Schlievert P.M.: Suppression of immunoglobulin-secreting cells from human peripheral blood by toxic-shock-syndrome toxin-1. *J. Infect. Dis.* **153**, 772–779 (1986)
45. Pragman A.A., Schlievert P.M.: Virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: the need for in vivo analysis of virulence factor regulation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. **42**, 147–154 (2004)
46. Price C.L., Al Hassi H.O., English N.R., Blakemore A.I., Stagg A.J., Knight S.C.: Methylglyoxal modulates immune responses: relevance to diabetes. *J. Cell. Mol. Med*. **14**, 1806–1815 (2010)
47. Przyjałkowski W.: Central nervous system infections. In Szczeklik A. (ed), Internal Diseases. The state of knowledge on year 2010, *Practical Medicine, Kraków*, s. 2149–2171 (2010)
48. Rodríguez E.A., Correa M.M., Ospina S., Atehortúa S.L., Jiménez J.N.: Differences in epidemiological and molecular characteristics of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* (MSSA-MRSA) in children from a university hospital and day care centers. *Plos One*, **9**, e101417 (2014)
49. Roliński J., Sacha T., Immunosuppression. In Szczeklik A. (ed), Internal Diseases. The state of knowledge on year 2010, *Practical Medicine, Kraków*, s. 1599–1608 (2010)
50. Salgado-Pabón W., Breshears L., Spaulding A.R., Merriman J.A., Stach C.S., Horswill A.R., Peterson M.L., Schlievert P.M.: Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* Infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. *M. bio.* **4**, 00494–00513 (2013)
51. Salgado-Pabón W., Schlievert P.M.: Models matter: the search for an effective *Staphylococcus aureus* vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 585–591 (2014)
52. Shah B.R., Huh J.E.: Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care*, **26**, 510–513 (2003)
53. Shallcross L.J., Fragaszy E., Johnson A.M., Hayward AC.: The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 43–54 (2013)
54. Shambat M., Haggar S., Vandenesch A., Lina F., van Wamel G., Arakere W.J., Swensson G., Norrby-Teglund M.A.: Levels of alpha-toxin correlate with distinct phenotypic response profiles of blood mononuclear cells and with agr background of community-associated *Staphylococcus aureus* isolates. *Plos One*, **9**, e106107 (2014)
55. Sieradzki J.: Diabetes mellitus and metabolic syndrome. In Szczeklik A. (ed), Internal Diseases. The state of knowledge on year 2010, *Practical Medicine, Kraków*, , s. 1243–1284 (2010)
56. Sollid J.U., Furberg A.S., Hanssen A.M., Johannessen M.: *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 531–41 (2014)
57. Spaan A.N., Schiepers A., de Haas C.J., van Hooijdonk D.D., Badiou C., Contamin H., Vandenesch F., Lina G., Gerard NP., Gerard C., van Kessel K.P., Henry T., van Strijp J.A.: Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Panton-Valentine Leukocidin and γ-Hemolysin CB with Human C5a Receptors. *J. Immunol*. **195**, 1034–1043 (2015).
58. Spaulding A.R., Salgado-Pabón W., Kohler P.L., Horswill A.R., Leung D.Y., Schlievert P.M.: Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev*. **26**, 422–447 (2013)
59. Spaulding A.R., Satterwhite E.A., Lin Y.C., Chuang-Smith O.N., Frank K.L., Merriman J.A., Schaefers M.M., Yarwood J.M., Peterson M.L., Schlievert P.M.: Comparison of *Staphylococcus aureus* strains for ability to cause infective endocarditis and lethal sepsis in rabbits. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 18 (2012)
60. Stoeckle M., Kaech C., Trampuz A., Zimmerli W.: The role of diabetes mellitus in patients with bloodstream infections. *Swiss Med. Wkly*. **138**, 512–529 (2008)
61. van Belkum A., Verkaik N.J., de Vogel C.P., Boelens H.A., Verveer J., Nouwen J.L., Verbrugh H.A., Wertheim H.F.L.: Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J. Infect. Dis.* **15**, 199,1820–1826 (2009)
62. Vandenesch F., Naimi T., Enright M.C., Lina G., Nimmo G.R., Heffernan H., Liassine N., Bes M., Greenland T., Reverdy M.E., Etienne J.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis*. **9**, 978–984 (2003)
63. Voyich J.M., Braughton K.R., Sturdevant D.E., Whitney A.R., Saïd-Salim B., Porcella S.F., Long R.D., Dorward D.W., Gardner D.J., Kreiswirth B.N., Musser JM., DeLeo F.R.: Insights into

mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J. Immunol.* **175**, 3907–3919 (2005)
64. Vu B.G., Gourronc F.A., Bernlohr D.A., Schlievert P.M., Klingelhutz A.J.: Staphylococcal superantigens stimulate immortalized human adipocytes to produce chemokines. *Plos One,* **8**, e77988 (2013)
65. Vu B.G., Stach C.S., Kulhankova K., Salgado-Pabón W., Klingelhutz A.J, Schlievert PM.: Chronic superantigen exposure induces systemic inflammation, elevated bloodstream endotoxin, and abnormal glucose tolerance in rabbits: possible role in diabetes. *M. Bio*. **24**, e02554 (2015)
66. Vu B.G., Stach C.S., Salgado-Pabón W., Diekema D.J., Gardner S.E., Schlievert P.M.: Superantigens of *Staphylococcus aureus* from patients with diabetic foot ulcers. *J. Infect. Dis*. **210**, 1920–1927 (2014)
67. Wertheim H.F., Melles D.C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A., Nouwen J.L.: The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis*. **5**, 751–762 (2005)
68. Xiong Y.Q., Willard J., Yeaman M.R., Cheung A.L., Bayer A.S.: Regulation of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin gene (hla) expression by agr, sarA, and sae in vitro and in experimental infective endocarditis. *J. Infect. Dis.* **194**, 1267–1275 (2006)
69. Yazdanpanah L., Nasiri M., Adarvishi S.: Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World J. Diabetes*. **15**, 37–53 (2015)
70. Zhai X., Qian G., Wang Y., Chen X., Lu J., Zhang Y., Huang Q., Wang Q.: Elevated B Cell Activation is Associated with Type 2 Diabetes Development in Obese Subjects. *Cell. Physiol. Biochem*. **38**, 1257–1266 (2016)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 179–193
http://www.pm.microbiology.pl

ZASTOSOWANIE SEKWENCJONOWANIA PEŁNOGENOMOWEGO DO GENOTYPOWANIA BAKTERII

Daria Artyszuk[1], Tomasz Wołkowicz[2]*

[1] Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski
[2] Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w październiku 2017 r., zaakceptowano w styczniu 2018 r.

1. Wprowadzenie. 1.1. Metody typowania. 2. Fenotypowe metody typowania. 3. Genetyczne metody typowania. 3.1. REA-PFGE. 3.2. MLVA. 3.3. MLST. 4. Techniki sekwencjonowania I generacji. 4.1. Metoda Sangera. 4.2. Metoda Maxama-Gilberta. 5. Sekwencjonowanie pełnogenomowe. 5.1. Sekwencjonowanie II generacji. 5.2. Sekwencjonowanie III generacji. 6. Typowanie molekularne z zastosowaniem sekwencjonowania pełnogenomowego. 6.1. K-mer. 6.2. SNP. 6.3. wgMLST 7. Trudności analiz. 7.1. Proces przetwarzania danych. 7.2. Przechowywanie i udostępnianie danych. 7.3. Nomenklatura. 8. Potencjalne kierunki rozwoju. WGS 9. Podsumowanie

Streszczenie: Typowanie molekularne służy do identyfikacji charakterystycznych celów genetycznych oraz określania podobieństwa genetycznego. W celu ustalenia podobieństwa bakterii, stosowane są zarówno klasyczne metody fenotypowe, jak i nowocześniejsze metody oparte na biologii molekularnej. Rozwój genetyki, a szczególnie wynalezienie nowszych technik, jakimi są metody oparte na technikach biologii molekularnej zrewolucjonizowało badania biologiczne, w tym badania mikroorganizmów. Po roku 1970, rozwój metod opartych na analizie sekwencji kwasu nukleinowego zapoczątkował erę mikrobiologii molekularnej, udostępniając tym samym nowoczesne narzędzia do identyfikacji źródeł zakażenia. Sekwencjonowanie pełnego genomu i inne techniki typowania o dużej przepustowości stają się coraz bardziej popularne, a dzięki wysokiej rozdzielczości, są idealnym narzędziem do analiz porównawczych bakterii. W poniższej pracy omówione zostały techniki najczęściej stosowane w typowaniu bakterii oraz te, które są dopiero w fazie tworzenia, a w przyszłości mogą stanowić główne narzędzie w typowaniu molekularnym bakterii.

Implementation of whole genome sequencing for bacteria genotyping

Abstract: The molecular typing methods are used to identify specific genetic targets and relationships between microbial isolates. In order to understand clonal relatedness between the microbial strains, classic phenotypic methods are used in line with modern molecular biology techniques. The development of genetics, especially new techniques like molecular typing, have revolutionized microbial research. After 1970, the development techniques, especially those referring to DNA sequencing, established molecular microbiology, thus providing modern tools for the identification of sources and routes of infection. Whole genome sequencing and other high-throughput typing methods are becoming increasingly popular and, thanks to their high resolution, they are ideal tools for comparative analysis of bacteria. This study reviews the methods most commonly used in the molecular typing of bacteria, including those which are in the development stage and may be the main tool in microbial typing in the future.

1. Introduction. 1.1. Typing methods. 2. Phenotypic typing methods. 3. Genetic typing methods. 3.1. REA-PFGE. 3.2. MLVA. 3.3. MLST. 4. 1st generation sequencing technology. 4.1. Sanger sequencing. 4.2. Maxam-Gilbert sequencing. 5. Whole genome sequencing. 5.1. 2nd generation sequencing. 5.2. 3rd generation sequencing. 6. Molecular typing using whole genome sequencing. 6.1. K-mer. 6.2. SNP. 6.3. wgMLST. 7. Analysis difficulties. 7.1. Data processing. 7.2. Data storage and sharing. 7.3. Nomenclature. 8. Potential directions of development. 9. Summary

Słowa kluczowe: analizy pełnogenomowe, genotypowanie, sekwencjonowanie nowej generacji, techniki molekularne
Key words: genotyping, molecular techniques, next-generation sequencing, whole genome analysis

1. Wprowadzenie

Typowanie molekularne (genotypowanie) służy do identyfikacji różnych charakterystycznych celów genetycznych, jak i określania podobieństwa genetycznego. Przy pomocy określonych markerów molekularnych, możliwe jest badanie owego podobieństwa genetycznego, mogącego bezpośrednio przekładać się na stopień pokrewieństwa między poszczególnymi izolatami. Zrozumienie tych powiązań pozwala zarówno na prowadzenie analiz filogenetycznych ustalając szlaki ewolucji i specjacji mikroorganizmów, jak i na nadzór danych epidemiologicznych, wykrywanie i monitoring ognisk infekcji, efektywniejszą kontrolę rozprzestrzeniania się zakażeń i w efekcie poprawę w zakresie zdrowia publicznego. Z punktu widzenia *stricte* naukowego, szczególnie istotne jest pierwsze wymienione zastosowanie typowania molekularnego. Taksonomia organizmów powinna bowiem jak najlepiej odzwierciedlać ewolucyjne pokrewieństwo. Klasyczna klasyfikacja bakterii opiera się

* Autor korespondencyjny: Tomasz Wołkowicz, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. 22 54-21-263, e-mail: twolkowicz@pzh.gov.pl

na cechach morfologicznych, immunologicznych, biochemicznych i fizjologicznych, a tylko w niewielkim stopniu na analizie kwasów nukleinowych. Stworzony w ten sposób system, z jednej strony bardzo trafnie odzwierciedlał różnice pomiędzy różnymi grupami bakterii (chociażby różnice w budowie ściany i błony zewnętrznej bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych). Z drugiej strony, zawiła analiza cech biochemicznych, takich jak zdolność do fermentacji różnych cukrów, dekarboksylacji różnych aminokwasów, wzrostu na różnych pożywkach etc. przywodziła na myśl bardziej analizę losowej zbieżności obarczonej dużą ilością przypadkowych fluktuacji. W momencie wprowadzania kryteriów molekularnych i porównywania sekwencji kwasów nukleinowych, analiza porównawcza mikroorganizmów opiera się na zależnościach filogenetycznych i staje się bardziej obiektywna, niż stosowane do tej pory porównania oparte głównie na różnicach w cechach fenotypowych. Pozwala to na analizowanie szczepów mało zróżnicowanych morfologicznie i określenie właściwości bakterii, których nie jesteśmy w stanie hodować w warunkach laboratoryjnych – VBNC (Viable But Non-Culturable). Tego typu analizy pozwalają też na sprecyzowanie definicji gatunku organizmu prokariotycznego i uwzględnienie w niej, oprócz cech fenotypowych, także parametrów molekularnych [36].

1.1. Metody typowania

Klasyczna identyfikacja bakterii skupia się głównie na coraz dokładniejszej klasyfikacji taksonomicznej. Im niższy poziom taksonomiczny, tym bardziej wymagające stają się szczegółowe analizy zróżnicowanych cech biochemicznych, cech serologicznych lub nawet różnic w podatności bakterii na działanie określonego faga lub bakteriocyny. Po roku 1970, rozwój metod opartych na analizie sekwencji kwasu nukleinowego zapoczątkował erę mikrobiologii molekularnej, udostępniając tym samym nowoczesne narzędzia do identyfikacji źródeł zakażenia. Kolejne lata kontynuowania i ulepszania technik biologii molekularnej zrewolucjonizowały dokładność i szybkość uzyskiwania analiz laboratoryjnych. Sekwencjonowanie pełnego genomu i inne techniki typowania o dużej przepustowości stają się coraz bardziej popularne, a dzięki szybkiemu mechanizmowi i wysokiej rozdzielczości, są idealnym narzędziem do analiz porównawczych patogenów bakteryjnych [33].

2. Fenotypowe metody typowania

Podczas rutynowej diagnostyki laboratoryjnej, prowadzonej zazwyczaj do poziomu gatunku, wciąż w głównej mierze wykorzystywane są metody fenotypowe. Metody te oparte są na analizie eksprymowanych cech zawartych w materiale genetycznym. Badania dotyczą głównie cech morfologicznych komórek bakteryjnych w preparatach mikroskopowych, testów biochemicznych, serologicznych oraz analizy cech morfologicznych kolonii (barwa, kształt, charakter wzrostu na różnych podłożach).

Z wykorzystaniem cech biochemicznych przyporządkowuje się poszczególne szczepy do określonych rodzajów, gatunków czy podgatunków. W testach biochemicznych określana jest zdolność do rozkładu lub produkcji określonego związku, a na podstawie uzyskanego wzoru tworzone są szeregi biochemiczne, specyficzne tylko dla danego gatunku bakterii. Metoda jest technicznie prosta w wykonaniu i nie wymaga dużego nakładu finansowego, lecz równocześnie może być praco- i czasochłonna, a wyniki, czasami rozbieżne, mogą wymagać dużego doświadczenia w interpretacji.

Kolejną ważną metodą jest serotypowanie. Polega ono na określeniu antygenów powierzchniowych przy użyciu odpowiedniego zestawu przeciwciał mono- lub poliklonalnych, jednak jego zastosowanie zazwyczaj ograniczone jest tylko do pojedynczych rodzajów lub gatunków. W zależności od antygenów znajdujących się na powierzchni komórki bakteryjnej, wyróżniane są odpowiednie typy serologiczne nazywane serotypami. Wygodną alternatywą do stosowania czystej surowicy są stosowane testy lateksowe, w których wykorzystuje się opłaszczone określonymi przeciwciałami cząstki lateksu. Podczas wykrycia specyficznego antygenu bakteryjnego, w badanej próbce zachodzi reakcja widocznej aglutynacji. Serotypowanie jest metodą relatywnie łatwą zarówno w wykonaniu, jak i interpretacji, dzięki czemu świetnie się nadaje do typowania dużej ilości izolatów. Przy odpowiedniej kontroli jakości można uzyskać dużą powtarzalność wyników. Zdolność różnicująca jest zależna od badanego izolatu, zachodzenia reakcji krzyżowych, czy jakości używanych odczynników. Ograniczeniem jest możliwość serotypowania niektórych organizmów tylko przez laboratoria referencyjne, posiadające odpowiednie surowice, niedostępne w sprzedaży lub posiadanie dużej ilości surowic (tak jak na przykład w przypadku serotypowania szczepów *Salmonella*). Dużą wadą metody jest także występowanie zjawiska autoaglutynacji (samoistne zlepianie się komórek bateryjnych) u tzw. szczepów szorstkich, które może uniemożliwić uzyskanie oczekiwanych wyników.

Typowanie bakteriofagowe polega na poddaniu izolatów działaniu odpowiedniego zestawu fagów i określeniu specyficznych dla bakterii wzorów fagowych. Odczytu dokonuje się poprzez określenie występowania oraz rodzaju łysinki na murawie bakteryjnej. Choć interpretacja zazwyczaj nie sprawia większych trudności, czasem może być niejednoznaczna i zaburzać wyniki badania. Mimo dużej zdolności różnicującej i powtarzalności uzyskiwanych analiz, wiele szczepów nie nadaje się do

identyfikacji tą metodą. Typowanie fagowe jest dość popularną, nadal używaną metodą, nadającą się do długoterminowego nadzoru, jednak jej stosowanie ograniczone jest w dużej mierze do laboratoriów referencyjnych. Stosuje się ją między innymi do typowania szczepów *Salmonella* i *Staphylococcus aureus* [53, 54].

3. Genetyczne metody typowania

Konwencjonalne metody, oparte na cechach fenotypowych (serotypowanie, typowanie bakteriofagowe) używane są *de facto* od początku istnienia mikrobiologii. Rozwój genetyki, a szczególnie wynalezienie nowszych technik, jakimi są metody oparte na technologii biologii molekularnej zrewolucjonizowało badania biologiczne w całości, w tym szczególnie badania mikroorganizmów. W chwili obecnej, metody genotypowe dostarczają narzędzi pozwalających na dokładne oznaczanie i coraz bardziej precyzyjne i dogłębne badanie mikroorganizmów. Najczęściej stosowane są metody oparte na technice PCR, wykrywające obecność określonych sekwencji w genomie analizowanego organizmu [5].

Dużą zaletą stosowania metod genotypowych jest skrócenie czasu analizy wyników, zwiększenie ich dokładności, a czasem nawet możliwość identyfikacji organizmów niedających się hodować w warunkach laboratoryjnych. Wybór stosowanej metody zależy od celu planowanego badania. Metody genetyczne mogą być stosowane zarówno do oznaczania przynależności mikroorganizmów do odpowiednich taksonów, jak i wykrywania markerów genetycznych kodujących różne istotne cechy fenotypowe (np. oznaczanie mechanizmów wirulencji czy oporności na antybiotyki). Opracowane zostały także techniki służące do analizy podobieństwa genetycznego izolatów tego samego taksonu.

Istnieje wiele metod genotypowania, które różnią się zarówno zastosowaną techniką molekularną, jak i celem genetycznym, a w efekcie zdolnością rozdzielczą, powtarzalnością wyników, kosztownością i czasochłonnością analizy etc. Ważnym czynnikiem jest łatwość, z jaką dane mogą być interpretowane oraz dostępność spójnych procedur i podstawowych danych porównawczych. Wszystkie te cechy przyczyniają się do jakości danych uzyskanych podczas typowania – ich korelacja z danymi epidemiologicznymi jest ważnym czynnikiem w wyborze odpowiedniej techniki typowania [33].

Do najważniejszych technik genotypowania należy REA-PFGE (Restriction Enzyme Analysis with Pulsed Field Gel Electrophoresis), MLST (Multi-Locus Sequence Typing) oraz MLVA (Multiple Locus Variable-number tandem repeats Analysis), szerzej opisane poniżej. Dodatkowo istnieje wiele technik, opartych na przykład na różnych układach PCR, takie jak ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – PCR), RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR), MP-PCR (Melting Profile – PCR), różnego rodzaju REP-PCR (Repetitive Element – PCR), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) etc., jednak są to metody obecnie mniej znaczące i ich opis przekracza ramy poniższej publikacji.

Żadna z istniejących technik nie jest metodą doskonałą. Każda ma zarówno wady, jak i zalety. Nie ma jednej, uniwersalnej metody, którą można by zastosować do każdego gatunku bakterii. Różna jest też ich zdolność rozdzielcza, co sprawia, że jedne z nich znajdą zastosowanie w lokalnym dochodzeniu epidemiologicznym, a drugie, o niższej sile dyskryminacyjnej, znajdą zastosowanie w analizach globalnych. Dlatego zrozumienie ich zalet, jak i ograniczeń, jest ważne dla poprawnego i właściwego dobrania metody do konkretnych celów badawczych. Techniki typowania molekularnego są wciąż ulepszane i cały czas pojawiają się ich nowsze, szybsze i tańsze modyfikacje. W poniższej pracy omówione zostały techniki najczęściej stosowane w typowaniu bakterii oraz te, które są dopiero w fazie tworzenia, a w przyszłości mogą stanowić główne narzędzie w typowaniu molekularnym bakterii.

3.1. REA-PFGE

Makrogenomowa analiza restrykcyjna z zastosowaniem techniki elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym – REA-PFGE (Restriction Enzyme Analysis with Pulsed Field Gel Electrophoresis, nazywana też w skrócie elektroforezą pulsacyjną) od wielu lat uznawana jest za „złoty standard" wśród metod typowania molekularnego. Oparta na analizie całego materiału genetycznego bakterii, nadal jest jedną z najczęściej używanych technik. W epidemiologii jest jednym z głównych narzędzi używanych do analiz ognisk i wyznaczania możliwych źródeł zakażenia.

Elektroforeza pulsacyjna polega na wymuszonej zmianie kierunku migracji cząstek DNA, spowodowanej przez zmiany pola elektrycznego. Przygotowanie analizy REA-PFGE polega na trawieniu dobrze oczyszczonego i immobilizowanego w bloczku agarozowym DNA rzadko tnącymi endonukleazami. W wyniku trawienia powstaje pula fragmentów DNA o różnych wielkościach [2]. Produkty trawienia restrykcyjnego zostają rozdzielone na żelu agarozowym, w zmiennym polu elektrycznym. Technika ta pozwala, w przeciwieństwie do klasycznej elektroforezy agarozowej, na rozdział bardzo długich fragmentów DNA, przekraczających nawet 1 Mpz. Rozdzielone fragmenty tworzą odpowiedni wzór, zwany profilem PFGE albo typem elektroforetycznym (ET), charakterystyczny dla danego szczepu.

Technika PFGE swoją popularność wśród naukowców zawdzięcza wysokiej sile dyskryminacyjnej (zdolności różnicującej) oraz dużej powtarzalności

otrzymywanych wyników. Dzięki wystandaryzowanym protokołom umożliwia też porównywanie wyników między laboratoriami. Dlatego też często uznawana jest za technikę referencyjną i służy do porównywania efektów końcowych uzyskiwanych innymi metodami typowania molekularnego.

Mimo dużej popularności tej metody genotypowania i możliwości przeprowadzania analiz globalnych, REA-PFGE posiada kilka wad i ograniczeń. Pierwszą z nich jest jej relatywnie niska przepustowość: metoda jest bardzo czasochłonna, wymaga kilku dni na przygotowanie i trawienie próbek oraz kolejnych 1–2 dni na elektroforezę i analizę wyników. Całość analizy musi być przeprowadzona przez odpowiednio wykwalifikowany personel. Jej stosowanie jest dodatkowo uzależnione od posiadania drogiego sprzętu i równie kosztownych odczynników. Co więcej, analiza wyników badania często obarczona jest pewną dozą subiektywizmu ze względu na różnice w rozróżnianiu podobnej wielkości fragmentów DNA, a także wyznaczenie granicznej wielkości analizowanych fragmentów. W konsekwencji, mimo iż uznaje się tę metodę za powtarzalną, mogą występować różnice interpretacyjne otrzymywanych profili. Porównywanie wyników PFGE wymaga specjalistycznego oprogramowania, procedur i standardów dla konsekwentnej analizy. Niewielkie różnice w protokołach lub zmiany parametrów elektroforezy mogą spowodować niezgodność danych i błędną analizę wyników [33].

Ujednolicenie protokołu wykonywania PFGE pozwoliło na stworzenie międzynarodowych baz danych, dzięki czemu możliwy stał się dokładniejszy nadzór epidemiologiczny. Wystandaryzowane protokoły PFGE zostały opracowane dla wielu patogenów bakteryjnych i stanowią podstawę dla międzynarodowych wzorców nadzoru zdrowia publicznego. Najpoważniejszą instytucją publikującą protokoły i zalecenia dotyczące tego typu analiz jest sieć PulseNet, który powstał w 1996 roku w celu poprawy jakości nadzoru i wykrywania wielu patogenów bakteryjnych powodujących zatrucia pokarmowe [33]. Procedura PFGE według PulseNet, to kilkudniowy, wystandaryzowany protokół laboratoryjny dotyczący typowania molekularnego niektórych patogenów. Opisuje on poszczególne etapy wykonywania badania i jest opracowany dla różnych gatunków bakterii, takich jak, np.: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, czy *Listeria monocytogenes*. Protokoły przygotowania próbek są co do istoty podobne, niezależnie od typowanego gatunku bakterii (głównie różnice występują pomiędzy bakteriami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi w stosowanych buforach do lizy oraz proteolizy). Jednak dla każdego gatunku bakterii jest dobrany odpowiedni (jeden lub kilka) enzym restrykcyjny oraz konkretne parametry rozdziału. Ujednolicenie protokołów umożliwiło wykrywanie i zestawienie szczepów z różnych regionów, a tym samym PFGE stało się świetnym narzędziem do globalnych analiz ognisk.

Na podstawie porównań profili PFGE poszczególnych izolatów można śledzić występowanie ognisk epidemicznych oraz poszukiwać źródeł zakażeń. Analiza pokrewieństwa na podstawie wytycznych i kryteriów zaproponowanych przez Tenover'a w 1995 roku, polega na wizualnej ocenie profili i różnic w ich prążkach [55]. Analiza jest wiarygodna, gdy wzór PFGE przedstawia co najmniej 10 różnych fragmentów. Według zastosowanych wytycznych, jeden izolat jest blisko spokrewniony z innym, gdy ilość różnic w ich wzorach restrykcyjnych wynosi od jednej do trzech. Możliwe pokrewieństwo jest przy różnicy od czterech do sześciu fragmentów, a izolaty niespokrewnione wykazują polimorfizm siedmiu lub więcej prążków. Interpretacja tą metodą przeznaczona jest do małych analiz obejmujących do ok. 30 izolatów, uzyskanych podczas badań epidemiologicznych w stosunkowo krótkich okresach czasu (1–3 miesiące). Wytyczne identyfikacji są rygorystyczne i nie nadają się do badań populacji organizmów zbieranych przez okres jednego roku lub dłuższy.

Obecnie w analizach stosuje się wyspecjalizowane programy komputerowe, które stosując specjalne algorytmy, współczynniki korelacji i algorytmy klasteryzacji wyliczają stopnień podobieństwa profili. Pozwalają one na wspólną analizę także kilku eksperymentów wykonanych z zastosowaniem różnych enzymów restrykcyjnych (w celu zwiększenia siły dyskryminacyjnej metody) [55].

3.2. MLVA

W genomach bakteryjnych istnieją regiony oparte na tandemowych sekwencjach repetytywnych zwanych VNTR (Variable Number of Tandem Repeats). Są to krótkie, tandemowe powtórzenia, których liczba jest cechą zmienną, zależną od licznych zdarzeń rekombinacyjnych, a powstały polimorfizm długości jest indywidualny dla danego szczepu bakterii. Metodą genotypowania opartą na tym procesie jest MLVA (Multiple Locus Variable-number tandem repeats Analysis) [50].

Profil MLVA jest oparty na liczbie występujących powtórzeń kilku wybranych i wystandaryzowanych VNTR. Dawniej analizę wielkości fragmentów prowadzono z zastosowaniem techniki elektroforezy poliakrylamidowej. Inną stosowaną techniką odczytu jest sekwencjonowanie uzyskanych fragmentów analizowanych VNTR. Obecnie najczęściej stosowaną techniką, zapewniającą dobry rozdział amplifikowanych fragmentów jest wysokonapięciowa elektroforeza kapilarna. Zwiększa to szybkość, jakość i powtarzalność uzyskiwanych wyników. Tego typu procedura MLVA obejmuje takie etapy jak: 1) amplifikacja regionów

VNTR z fluorescencyjnie znakowanymi starterami, 2) określenie długości fragmentów z zastosowaniem techniki elektroforezy kapilarnej, 3) kalkulacja ilości powtórzeń [18]. Użycie sekwenatora DNA i znakowanych starterów z fluorescencyjnymi barwnikami, pozwala na analizę amplikonów w jednym procesie (multiplex PCR), co zwiększa efektywność tej metody. Różne cząsteczki fluoroforu włączone w amplikony absorbują wiązkę lasera i przez to uwalniają światło o różnej długości fali, dzięki czemu mogą być identyfikowane przez detektor w sekwenatorze. Przy użyciu odpowiedniego komputerowego oprogramowania, każde *locus* jest rozpoznawane na otrzymanych elektroforegramach na podstawie ich kolorów, a liczba powtórzeń w danym VNTR jest zliczana automatycznie. Określanie rozmiaru przy użyciu sekwenatora jest zdecydowanie precyzyjniejsze, niż na żelu poliakrylamidowym [50].

MLVA jest techniką szybką i prostą w wykonaniu (w przypadku stosowania wyznakowanych VNTR oznaczanych na sekwenatorze). Generuje powtarzalne i jednoznaczne dane. Zazwyczaj MLVA ma także lepszą siłę dyskryminacyjną niż PFGE (np. dla *Salmonella* Typhimurium) [31]. Jest to metoda używana jako uzupełnienie lub alternatywa dla PFGE, np. przy pracy z patogenami układu pokarmowego [28].

Ograniczeniem metody jest brak uniwersalności – regiony VNTR, jak i amplifikujące je startery muszą być wybierane i projektowane specjalnie pod dany patogen. Kilka wystandaryzowanych protokołów jest dostępnych, jednak tylko najistotniejsze z punktu widzenia zdrowia publicznego patogeny mogą być różnicowane tą metodą. Dostępne są procedury dla typowania m.in. *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium czy *Yersinia enterocolitica* [18, 22]. Metoda ta znajduje zastosowanie w identyfikacji także czynników mogących stanowić zagrożenie bioterrorystyczne, takich jak *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* czy *Yersinia pestis* [32, 6].

Metoda MLVA posiada obecnie wiele odmian. Jedną z nich jest używana na całym świecie metoda typowania *Mycobacterium tuberculosis*, wykorzystująca motywy MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units- Variable-Number Tandem Repeat) [8]. Często spotykane jest również *spa*-typowanie, polegające na sekwencjonowaniu krótkich sekwencji repetytywnych znajdujących się w genie kodującym gronkowcową proteinę A. Jest to jedna z metod typowania metycylino-opornych gronkowców złocistych (MRSA – Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) [33].

Jako, że VNTR bardzo szybko ewoluują, MLVA ma teoretyczną zdolność różnicującą zdecydowanie wyższą niż większość innych metod typowania. Stąd też znajduje zastosowanie w lokalnej analizie ognisk epidemicznych. Jednak nie nadaje się do określania relacji filogenetycznych i jest nieodpowiednia do długoterminowego, globalnego nadzoru epidemiologicznego. Z powodu występowania insercji lub delecji w amplifikowanych sekwencjach, różnice w wielkości *locus* z VNTR nie zawsze odzwierciedlają realną liczbę tandemowych powtórzeń [30].

Dla niektórych patogenów, takich jak, na przykład *Salmonella* Enteritidis, metoda MLVA staje się nowym standardem typowania. Pierwszym krokiem w kierunku standaryzacji procesu było opublikowanie procedury opracowanej dla *Salmonella* Typhimurium przez ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) [18]. W Europie, MLVA oparte na analizie 5 *loci* jest metodą używaną zarówno w laboratoriach weterynaryjnych, laboratoriach monitorujących bezpieczeństwo żywności, jak i przy nadzorze zdrowia publicznego [32]. Również PulseNet rekomenduje metodę MLVA jako technikę uzupełniającą do PFGE pozwalającą zwiększyć siłę dyskryminacyjną analiz [10].

3.3. MLST

Kolejną techniką typowania molekularnego bakterii, która znalazła zastosowanie w badaniach podobieństwa genetycznego szczepów podczas dochodzeń epidemiologicznych, jest metoda MLST (Multi-Locus Sequence Typing). Pierwszy schemat został zastosowany przez Maiden'a i wsp. do bakterii *Neisseria meningitidis* w 1998 roku. Od tamtej pory notowany jest ciągły wzrost zainteresowania tą metodą. Proces opiera się na sekwencjonowaniu z reguły siedmiu genów metabolizmu podstawowego (tak zwane „housekeeping genes") [35]. Uzyskane sekwencje są porównywane ze wszystkimi wcześniej opisanymi sekwencjami (allelami) danego *locus* i nadaje im się odpowiedni numer (numer allelu). Ich konfiguracja tworzy profil alleliczny danego szczepu używany do przypisania odpowiedniego typu sekwencyjnego – ST (Sequence Type) [50].

Bazy danych MLST są dostępne na serwerach internetowych, zlokalizowanych m.in. w Imperial College London (www.mlst.net) [39] i Oxford University (www.pubmlst.org) [13], w których zawarte są także protokoły badania zawierające sekwencje starterów, narzędzia do analiz sekwencji alleli i ST oraz interfejs pomocny w uzyskiwaniu danych epidemiologicznych. Pozwoliło to na scentralizowany dostęp do protokołów metody, narzędzi do analizowania sekwencji, bazy sekwencji referencyjnych i listy typów sekwencyjnych (ST) wśród pracowników naukowych [1].

Niektóre z zaprojektowanych starterów do MLST wykorzystują strategię zagnieżdżonej reakcji PCR (nested PCR), w której początkowo wykorzystuje się fragmenty DNA większe od ostatecznie wymaganych. Strategia ta często jest stosowana w reakcji sekwencjonowania w metodologii Sangera. Startery takie dają

wyższą jakość otrzymywanych sekwencji nukleotydowych oraz eliminują późniejsze sekwencjonowanie niespecyficznych produktów. Co za tym idzie, warunki amplifikacji w PCR mogą być mniej rygorystyczne. Jest to korzystne w przypadku bakterii, u których występuje polimorfizm amplifikowanego genu [56].

Wspomniane wyżej bazy danych zawierają informacje i badania dla różnych rodzajów lub gatunków bakterii i eukariontów (na przykład drożdżaków). Dla wielu z nich, włączając w to rodzaje, takie jak: *Listeria*, *Chlamydophila* i *Vibrio*, metoda została zmodyfikowana do tak zwanej MVLST (Multiple Virulence Locus Sequence Typing). Polega ona na analizie sekwencji genów wirulencji [33].

W roku 2005 została zaproponowana przez Yi Chen i wsp. [11] odmiana metody MVLST. Oprócz określonych wcześniej kilku genów, brane są pod uwagę także inne geny wirulencji oraz geny odpowiedzialne za transmisję bakterii. Strategia MELST (Multi-Epidemic--Locus Sequence Typing) ma stanowić idealne narzędzie do badania znaczenia epidemiologicznego *L. monocytogenes* lub innych bakterii patogennych.

MLST dostarcza jednoznaczne i powtarzalne wyniki. Metoda jest uznawana jako złoty standard w genotypowaniu dla wielu bakteryjnych patogenów dzięki ogólnemu dostępowi do sekwencji, narzędzi ich analizowania oraz porównywania [33]. Fakt, że technika MLST bazuje na analizie wysoce konserwowanych sekwencji genów metabolizmu podstawowego, ogranicza dość istotnie rozdzielczość tej metody. Dzięki temu zazwyczaj nie jest ona dobrym narzędziem do analizy lokalnych ognisk zakażeń. Ma jednak istotną rolę w szerszych analizach populacji, przepływu szczepów czy też analizie ognisk w skali globalnej [33]. W przypadku niektórych bakterii metoda ta może wykazywać nawet większą zdolność różnicującą niż PFGE, czego przykładem może być genotypowanie *Vibrio cholerae* [26].

4. Techniki sekwencjonowania I generacji

Technika MLST jest jedną z szerzej stosowanych metod opartych o analizę sekwencji DNA. Klasyczne sekwencjonowanie może również być stosowane w analizie MLVA w sytuacji, gdy nie są stosowane znakowane startery. W obecnych czasach rozwój technik sekwencjonowania DNA sprawia, że tego typu analizy stale zyskują na znaczeniu.

4.1. Metoda Sangera

Pierwszą poznaną techniką sekwencjonowania DNA jest wprowadzona przez Sangera metoda terminacji wydłużania łańcucha DNA. Technika ta, nazywana dideoxy sekwencjonowaniem, polega w obecnym kształcie na syntezie różnej długości wyznakowanych fragmentów DNA. Proces odbywa się z użyciem polimerazy odpowiedzialnej za replikację DNA oraz wyznakowanych dideoksynukleotydów hamujących etap elongacji amplifikowanego kwasu nukleinowego [52]. Dzięki temu, po przeprowadzeniu wielu cykli reakcji znakowania (w ogólnym zarysie homologicznych do cykli reakcji PCR) otrzymujemy pulę fragmentów DNA, różniących się długością o pojedynczy nukleotyd i zakończonych odpowiednio wyznakowanym fluorescencyjnie dideoksynukleotydem. Obecnie, w celu odczytania tak przeprowadzonej reakcji sekwencjonowania stosuje się wysokonapięciową elektroforezę kapilarną. Po dzień dzisiejszy jest to metoda ciesząca się dużą popularnością wśród naukowców na całym świecie, pozwalająca na uzyskanie relatywnie długich odczytów (czasami przekraczających 1 kpz). Dużą zaletą jest też możliwość weryfikacji jakości uzyskanych odczytów poprzez analizę chromatogramów.

4.2. Metoda Maxama-Gilberta

Równocześnie z opracowywaną przez Sangera techniką dideoksy, Maxam i Gilbert (w 1977 roku) [38] opracowali alternatywną metodę sekwencjonowania. W pierwszym etapie, dwuniciowe DNA zostaje wyznakowane na końcu 5' każdej nici. Przeprowadzona następnie denaturacja powoduje zniszczenie połączeń między łańcuchami DNA oraz umożliwia rozdział fragmentów w elektroforezie żelowej. Po zakończonym procesie wybrany fragment zostaje oczyszczony z żelu i podzielony na cztery części. Każda z tych części zostaje poddana innej reakcji znakowania, wykorzystującej odczynniki specyficzne względem konkretnego nukleotydu. Następuje modyfikacja zasady azotowej, a w konsekwencji jej oderwanie od reszty cukrowej. Na tym etapie dodanie drugiego odczynnika – piperydyny skutkuje przecięciem nici DNA w miejscach pozbawionych zasady azotowej i powstaniem znakowanych fragmentów o różnej długości. Rozdział elektroforetyczny uzyskanych cząsteczek oraz obrazowanie metodą autoradiografii pozwala na uwidocznienie prążków i określenie sekwencji DNA. Technika chemicznej degradacji DNA nie zyskała popularności wśród naukowców i obecnie jest stosowana niezmiernie rzadko.

5. Sekwencjonowanie pełnogenomowe

Od czasu powstania techniki terminacji łańcucha, nazywanej często metodą pierwszej generacji, sekwencjonowanie DNA jest intensywnie udoskonalane i modyfikowane, co pozwala na jeszcze efektywniejsze odczytywanie kolejności nukleotydów kwasu nukleinowego. W 1987 roku dostępne stały się metody

sekwencjonowania automatycznego. Dzięki zastosowaniu znaczników fluorescencyjnych, możliwe stało się zmodyfikowanie procedury sekwencjonowania Sangera i rozdzielanie fragmentów DNA w jednej reakcji. Do każdego dideoksynukleotydu zostaje przyłączony fluorochrom emitujący światło o innej długości fali. Dzięki wzbudzeniu barwników laserem, detektor fluorescencji wychwytuje emisję charakterystyczną dla danego fluorochromu. Analiza sygnału pochodzącego z emisji barwnika jest przeprowadzana dla każdego z badanych fragmentów i pozwala na analizę sekwencji łańcucha DNA w czasie rzeczywistym [48].

Przełomowym w dziedzinie sekwencjonowania DNA okazał się rok 1995, w którym opublikowano wyniki analizy genomu wykorzystującej metodę „shotgun". Dzięki temu, z powodzeniem zsekwencjonowano cały genom bakterii *Haemophilus influenzae*, a kilka miesięcy później *Mycoplasma genitalium* [19, 20]. Fragmenty genomu uzyskiwane są przez poddanie DNA procesowi sonikacji lub trawieniu nukleazą. Powstałe w procesie elektroforezy agarozowej cząsteczki o długości 1,6–2,0 kpz zostają wyizolowane i ligowane z wektorem plazmidowym. Bakterie (zwykle *E. coli*) poddawane są transformacji wektorem z wklonowanym fragmentem, który następnie jest powielany i sekwencjonowany. Tak wytworzona biblioteka DNA służy do sekwencjonowania genomu bakteryjnego. Proces sekwencjonowania dużej ilości klonów odbywa się z zastosowaniem starterów komplementarnych do używanego wektora. Ilościowy nadmiar otrzymanych sekwencji analizowanego genomu powinien reprezentować od 6 do 8-krotnej długości badanego genomu (pokrycie genomu). Po zakończonym etapie sekwencjonowania następuje komputerowe składanie uzyskanych fragmentów. W rezultacie otrzymywane są tzw. kontigi, czyli ciągłe sekwencje, z których każda reprezentuje inną część genomu, wspólnie pokrywając cały analizowany genom [19, 7].

Opracowanie metody „shotgun" spowodowało szybki rozwój genomiki, gdyż kolejne techniki sekwencjonowania były opracowywane właśnie pod kątem powstawania bardzo dużej ilości krótkich i losowych odczytów, ostatecznie pokrywających mniej więcej pełny genom. W 2005 roku, wraz z wprowadzeniem na rynek pierwszej kompletnej, komercyjnie dostępnej platformy – systemu Roche 454, rozpoczęła się era sekwencjonowania nowej generacji – NGS (Next-generation Genome Sequencing) [37]. Metody nowej generacji pozwalają na uzyskanie wyników w stosunkowo krótkim czasie. W 2007 roku, pojedyncze sekwencjonowanie umożliwiało wytworzenie 1 Gb danych. Do roku 2012 wielkość ta wzrosła 1000-krotnie, do 1 Tb informacji. Razem ze wzrostem wydajności, nastąpiło obniżenie kosztów genotypowania mikroorganizmów. W latach 90-tych, trwające rok sekwencjonowanie 1.8 Mb genomu *H. influenzae* metodą elektroforezy kapilarnej kosztowało około 1 miliona dolarów. W 2013 roku, sekwencjonowanie 4,5 Mb genomu *E. coli* zostało wykonane w jeden dzień, za ułamek kosztów [23].

Dalszy, bardzo szybki rozwój technik sekwencjonowania pełnogenomowego sprawił, że obecnie metody NGS dzielimy odpowiednio na II i III generację. Podział ten jest jednak bardzo umowny i coraz częściej techniki te określa się po prostu jako techniki sekwencjonowania pełnogenomowego (WGS – Whole Genome Sequencing).

Zestawienie wydajności i efektywności najważniejszych platform sekwencjonowania pełnogenomowego przedstawiono w tabeli I.

5.1. Sekwencjonowanie II generacji

Sekwencjonowanie drugiej generacji opiera się na replikacji pojedynczej cząsteczki DNA umieszczonej w stałym podłożu (np. w ziarnie) oraz procesie

Tabela I
Porównanie technik sekwencjonowania

Generacja NGS	Platforma	Czas trwania procesu* [dni]	Długość odczytu*	Całkowita ilość uzyskiwanych odczytów* [Gpz]	Całkowity koszt procesu** [$]
I	**Sanger**	0,5	1000 pz	1000	10
II	**Roche 454**	3–5	300 pz	0,7	1500–2000
	HiSeq	3–5	100–140 pz	125–1500	~3000
	MiSeq	3–5	150–250 pz	0,3–15	~1000
	IonTorrent	2–4	100–350 pz	0,6–15	~1000
	SOLiD	8	110 pz	80–320	~2000
III	**PacBio**	2–4	10–20 kpz	5–8	~1000
	Nanopore	do 2	10 kpz–1 Mpz	10–20	~1000

* w zależności od stosowanego urządzenia
** cena za jeden odczyt (sekwencjonowanie danych z jednej płytki (flow cell)) wg. C.S. Pareek [47]

sekwencjonowania. Pofragmentowane i odpowiednio do danej metodyki zmodyfikowane odcinki kwasu nukleinowego zostają zsekwencjonowane, a otrzymane odczyty zostają złożone w kontigi. Techniki II generacji pozwalają na usprawnienie procesu przygotowania biblioteki i sekwencjonowania, a w efekcie na znaczne zwiększenie wydajności procesu w porównaniu do etapów sekwencjonowania I generacji [47].

Roche 454

Platforma Roche 454 była pierwszym komercyjnie dostępnym systemem NGS. Wprowadzona została w 2005 roku i bazowała na technice zwanej pirosekwencjonowaniem opracowanej w roku 1998 [49]. Polega ona na przeprowadzeniu trzech etapów: 1) fragmentacja genomowego DNA i przyłączenie adaptorów, 2) powielenie fragmentów za pomocą emulsyjnego PCR (emPCR) oraz 3) pirosekwencjonowanie.

Przygotowanie próbek należy rozpocząć od sporządzenia biblioteki DNA. Jej produkcja polega na fragmentacji genomowego DNA (gDNA) i otrzymaniu krótkich, jednoniciowych odcinków. W procesie ligacji, do tak przygotowanych matryc dołączane zostają adaptory, które umożliwiają amplifikację i późniejsze sekwencjonowanie. Adaptory są odcinkami DNA o znanej sekwencji nukleotydowej i odpowiednim wyznakowaniu. Jeden z nich zawiera na swoim końcu 5' biotynę, która pozwala na immobilizację cząstek DNA do ziaren opłaszczonych streptawidyną. Po zajściu denaturacji, pojedyncze nici zostają uwolnione i używane jako biblioteka DNA niezbędna do procesu emPCR. Uzyskane jednoniciowe fragmenty są wiązane do ziaren opłaszczonych starterami, komplementarnymi do sekwencji adaptora związanego z cząsteczką DNA.

Warunkiem nastąpienia reakcji emPCR jest występowanie tylko jednego ziarna z daną sekwencją DNA w jednej kropli wody. W procesie tym, amplifikacja wszystkich odcinków następuje w tym samym czasie. Rozpoczęcie tego etapu pozwala na uzyskanie sygnału świetlnego, występującego podczas detekcji nukleotydów. Amplikony przy pomocy obecnej na kulkach magnetycznych streptawidyny, związanej z biotyną występującą na końcu odcinka DNA, rozdzielane są do jednoniciowych matryc używanych w procesie pirosekwencjonowania [37].

Etap pirosekwencjonowania oparty jest na sekwencjonowaniu poprzez syntezę. Ziarna z DNA umieszczane są w płytce PTP (PicoTiter Plate). Płytka zawiera enzymy, takie jak lucyferaza i sulfurylaza oraz warstwę odpowiedzialną za odpowiednie ułożenie ziaren. Detekcję wbudowanego przez polimerazę komplementarnego nukleotydu umożliwia towarzyszące reakcji emitowane światło. Impuls świetlny jest konsekwencją szeregu procesów prowadzących do powstania błysku na skutek chemiluminescencji. Rozpoznanie sygnału odbywa się za pomocą kamery CCD (Charged-Coupled Device) połączonej z płytką PTP i rejestrowane jest w formie pirogramu [47]. Intensywność otrzymanego sygnału świetlnego zależy od ilości wbudowanych nukleotydów. Korelacja ta może być przyczyną uzyskania błędnych wyników podczas analizy fragmentu zawierającego wiele powtórzeń zasad azotowych.

Illumina Solexa

Obecnie technika pirosekwencjonowania została wyparta z powszechnego użytku, przede wszystkim przez popularne sekwencjonowanie opracowane przez spółkę Illumina. Co ciekawe, podstawy metody zostały opracowane w roku 1994, a więc przed opracowaniem metody pirosekwencjonowania [9].

Sekwencjonowanie to oparte jest na odwracalnej terminacji zmodyfikowanych nukleotydów, gdzie każda z czterech zasad jest oznaczona innym fluorescencyjnym barwnikiem. W pierwszym etapie tworzona jest biblioteka fragmentów DNA wytworzonych w reakcji nebulizacji. Biblioteka DNA jest przygotowywana poprzez losową fragmentację fizyczną (sonikację) lub poprzez fragmentację enzymatyczną – tagmentację, która łączy etap fragmentacji i ligacji odcinków DNA w jeden proces, znacznie zwiększając wydajność procesu przygotowania biblioteki [25]. Do uzyskanych fragmentów przyłączone zostają dwuniciowe adaptory wiążące odcinki na płytce.

W reakcji multiplex, do każdej próbki dołączane zostają specyficzne znaczniki (barcode), które umożliwiają identyfikację próbek podczas późniejszej analizy danych. To unikalne sekwencje ligowane do fragmentów DNA w trakcie tworzenia biblioteki. Znaczniki Illumina zawierają od 8 do 12 par zasad i zazwyczaj są składowymi adaptorów lub starterów PCR. Dzięki zastosowaniu indywidualnych oznaczeń, biblioteki DNA mogą być łączone i sekwencjonowane w jednym procesie [24].

Kolejnym krokiem jest przeprowadzenie denaturacji i uzyskanie jednoniciowych matryc do reakcji amplifikacji przy pomocy reakcji PCR „koci grzbiet". Uprzednio immobilizowane na płytce fragmenty DNA znajdują komplementarną sekwencję adaptora również związanego z płytką i tworzą strukturę „koci grzbiet", co pozwala polimerazie na dobudowanie komplementarnej nici DNA. Odbywające się cyklicznie procesy syntezy i denaturacji pozwalają uzyskać nawet 1000 kopii danego odcinka DNA.

Uzyskana w danym sektorze odpowiednia ilość kopii badanego fragmentu jest sekwencjonowana poprzez syntezę zmodyfikowanych nukleotydów. Każdy z nich jest znakowany innym, podatnym na usunięcie fluorochromem. Po przyłączeniu komplementarnego nukleotydu kamera CCD rejestruje sygnały pochodzące z całej powierzchni płytki. Następuje usunięcie fluorochro-

mów, cykl rozpoczyna się ponownie i przyłączone zostają kolejne znakowane nukleotydy [47].

IonTorrent

Obecnie drugą, obok Illuminy, najczęściej stosowaną platformą NGS jest system IonTorrent. Przebieg procesu jest zbliżony do wykorzystywanego przy technice Roche 454 (tworzenie biblioteki DNA oraz amplifikacja fragmentów przy pomocy emulsyjnego PCR), jednak wyróżnia się sposobem detekcji, który zamiast pirosekwencjonowania wykorzystuje cykliczne zmiany pH roztworu. Podczas syntezy kolejnych nukleotydów przez polimerazę DNA uwalniane zostają kationy wodorowe. Przy pomocy detektora zostaje zmierzony sygnał, przejawiający się skokiem napięcia, który jest wprost proporcjonalny do ilości przyłączonych nukleotydów.

Główną zaletą IonTorrent jest brak konieczności modyfikacji nukleotydów oraz stosowania specjalnych enzymów. Dzięki elektronicznej detekcji sygnału sekwencjonowanie nie zajmuje dużo czasu [47]. Analogicznie do platformy Roche 454, intensywność sygnału IonTorrent zależy od ilości włączonych nukleotydów, co może przyczynić się do powstawania błędów przy odczytach sekwencji homopolimerycznych.

SOLiD

Sekwencjonowanie przy użyciu techniki SOLiD (Support Oligonucleotide Ligation and Detection), analogicznie do metody Roche 454, wymaga przygotowania biblioteki DNA z przyłączonymi adaptorami oraz amplifikacji z zastosowaniem emulsyjnego PCR. Kolejny etap polega na naprzemiennej ligacji komplementarnych sekwencji składających się ze zmodyfikowanych ośmiu nukleotydów, występujących w określonych pozycjach i wyznakowanych czterema różnymi znacznikami. Po każdym etapie nowo powstała nić jest usuwana, a dołączony zostaje nowy starter, będący krótszy o jeden nukleotyd od poprzedniego. Naprzemienna ligacja poprzedzona jest usunięciem startera wraz z trzema nukleotydami i odbywa się w następujących po sobie pięciu etapach, kolejno dla znaczników o innej długości: n, n-1, n-2, n-3, n-4. Każdy z czterech fluoroforów odpowiada konkretnej zasadzie azotowej, co umożliwia detekcję przyłączanych nukleotydów przy pomocy skanera laserowego [46].

5.2 Sekwencjonowanie III generacji

Technologia III generacji umożliwia wykonywanie procesu sekwencjonowania z pojedynczej cząsteczki DNA, bez konieczności jej wcześniejszej amplifikacji. Techniki te pozwalają na jeszcze większe usprawnienie procesu sekwencjonowania oraz otrzymywanie coraz dłuższych pojedynczych odczytów.

PacBio

Zasada działania sekwenatora PacBio opiera się na procesie sekwencjonowania poprzez syntezę. W pierwszym etapie zostaje przygotowana biblioteka DNA. Analizowane fragmenty są poddawane fragmentacji oraz przyłączone zostają znakowane adaptory. Proces sekwencjonowania przeprowadzany jest w metalowych dołkach szklanej mikropłytki ZMW (Zero-Mode Waveguides). Na ich dnie zostaje umieszczona polimeraza DNA, która umożliwia przyłączanie komplementarnych nukleotydów do tworzonej nici. Nukleotydy zostają wyznakowane poprzez przyłączenie do grupy fosforanowej odpowiedniego fluoroforu (każdy nukleotyd wyznakowany innym fluorochromem) i wraz z jednoniciowymi fragmentami DNA również zostają umieszczone w dołkach mikropłytki. Mikropłytka ZMW zmniejsza tło generowane przez nukleotydy niewłączone do nici DNA. Uwalnianie pirofosforanu wraz z fluoroforem, które towarzyszy przyłączeniu komplementarnego nukleotydu do nici DNA umożliwia detekcję rodzaju włączonego nukleotydu i analizę wyników procesu [27].

Zaletą technologii PacBio jest możliwość generowania długich odczytów, sięgających 10–20 kpz. Niestety jest to równocześnie technika bardzo kosztowna, ze względu na zarówno cenę aparatury, jak i koszt pojedynczych odczytów.

Nanopore

Obecnie jedną z ciekawszych i prężnie rozwijających się strategii sekwencjonowania jest technologia opracowana przez Oxford Nanopore Technologies. W ogólnym schemacie polega ona na bezpośrednim odczycie sekwencji nukleotydowej, a więc odbywa się bez modyfikowania nukleotydów oraz bez dodawania syntezy na etapie odczytu. Analizowana nić DNA jest rozplatana, a następnie przepuszczana przez specjalne białka porowe znajdujące się w elektrycznie opornej membranie polimerowej. Podczas translokacji przez białko porowe, każdy z czterech nukleotydów powoduje inną zmianę parametrów elektrycznych membrany. Każdy kanał nanoporu umieszczony w urządzeniu działa niezależnie, co umożliwia przeprowadzanie wielu reakcji sekwencjonowania w tym samym czasie [43].

Takie bardzo bezpośrednie podejście do sekwencjonowania DNA niesie za sobą kilka istotnych zalet. W zależności od stosowanego protokołu oraz zestawu odczynników, przygotowanie biblioteki może zajmować od około 20 minut do 4 godzin, choć przy zastosowaniu urządzenia Voltrax lub specjalnych protokołów, może zostać dodatkowo skrócone do około 5–10 minut [45]. Inną ważną zaletą jest generowanie bardzo długich ciągłych odczytów, a jedynym elementem limitującym jest fizyczna fragmentacja nici DNA podczas preparatyki. Co więcej, dane podczas procesu sekwencjonowania

są przesyłane w czasie rzeczywistym i tak też mogą być analizowane.

Technika sekwencjonowania z udziałem nanoporów umożliwia konstruowanie bardzo małych urządzeń. Przykładem tego jest przenośny sekwenator MinION, zaprojektowany przez firmę Oxford Nanopore Technologies, który jest dostępny na rynku od maja 2015 roku. Urządzenie waży mniej niż 100 gram i za pomocą przewodu USB jest podłączane bezpośrednio do komputera [44]. Dzięki niewielkiemu rozmiarowi urządzenia i łatwości wykonania analizy, MinION został wykorzystany do pierwszego sekwencjonowania DNA na Międzynarodowej Stacji Kosmicznej [41], a także do identyfikacji mikrobiomu obecnego na arktycznym lodowcu [14].

Obecnie w fazie testów znajduje się urządzenie o dużo większej przepustowości o nazwie PromethION. Urządzenie to jest stacjonarną wersją sekwenatora MinION, przeznaczoną do wysokiej jakości sekwencjonowania dużych ilości próbek. PromethION zawiera łącznie 144 tysiące kanałów nanoporowych (w porównaniu do 512 kanałów obecnych na płytce MinION-a). Dzięki takiej przepustowości urządzenie to mogłoby stanowić użyteczne narzędzie, szczególnie na poziomie centralnych laboratoriów badających liczne próbki i izolaty na potrzeby zdrowia publicznego.

6. Typowanie molekularne z zastosowaniem sekwencjonowania pełnogenomowego

Rozwój nowych technik typowania molekularnego bakterii, w szczególności technik sekwencjonowania pełnogenomowego, umożliwił znaczny postęp w nadzorze zakażeń bakteryjnych. Analizy WGS pozwalają na uzyskiwanie większej ilości danych i charakteryzują się wyższą rozdzielczością. Dzięki temu, wysokiej jakości dane mogą być wykorzystywane przy określaniu dróg transmisji mikroorganizmów. Mimo dostępności wielu różnorodnych narzędzi do interpretacji danych WGS, genotypowanie wykorzystujące tego typu dane wciąż nie ma ustalonego konsensusu, a standaryzacja protokołów, walidacja metod, program kontroli jakości oraz stworzenie odpowiedniej bazy danych wymaga dalszego rozwoju [16]. Międzynarodowe projekty, takie jak, na przykład COMPARE, polegają na ujednoliceniu najnowszych technologii sekwencjonowania oraz metod przetwarzania i analizy danych. Celem jest stworzenie globalnej bazy sekwencji genomów, w połączeniu z danymi klinicznymi i epidemiologicznymi [12].

Mimo wyzwań związanych z implementacją i stosowaniem sekwencjonowania pełnogenomowego, metody te posiadają wiele przemawiających za nimi zalet. Jedną z nich jest uniwersalna aplikacyjność do wszystkich organizmów. Analiza może zostać wykorzystana do charakteryzowania mikroorganizmów pod kątem występowania genów wirulencji lub genów kodujących mechanizmy warunkujące antybiotykooporność oraz do przewidywania cech fenotypowych, takich jak np. serotyp. Co więcej, sekwencjonowanie genomów dostarcza dane pozwalające na uzyskanie oceny stopnia genetycznego podobieństwa pomiędzy izolatami [40].

Istotną składową schematu analitycznego badań pełnogenomowych jest analiza bioinformatyczna. Po zakończonym etapie sekwencjonowania następuje komputerowe składanie uzyskanych odczytów. Złożenie fragmentów może odbywać się przy pomocy dwóch metod: resekwencjonowania – wykorzystującego dostępną w bazie danych sekwencję referencyjną oraz składania *de novo* – bez użycia sekwencji odniesienia.

Wykrywanie w poskładanej sekwencji odpowiednich genów jest analizą relatywnie prostą, realizowaną poprzez przyrównanie analizowanej sekwencji do sekwencji w odpowiedniej bazie danych. W ten sposób możliwe jest nie tylko wykrycie potencjalnych mechanizmów wirulencji (np. na potrzeby identyfikacji konkretnego patotypu), czy identyfikacja genów lub mutacji warunkujących oporność na antybiotyki, ale również wykrycie plazmidowych *ori* replikacyjnych (na potrzeby identyfikacji plazmidów) lub sekwencji specyficznych dla danego gatunku czy serotypu. Trudniejszą analizą jest stwierdzenie poziomu podobieństwa genetycznego badanych izolatów. Istnieje kilka wariantów przeprowadzenia tego typu analizy z wykorzystaniem danych pełnogenomowych. Trzy główne metody to: analizy z użyciem sekwencji k-mer, mutacji punktowych (SNP) oraz pełnogenomowe MLST (wg MLST).

6.1. K-mer

K-mer to krótka sekwencja DNA złożona z określonej liczby („k") nukleotydów. Kolejne k-mery służą w analizach bioinformatycznych do stworzenia macierzy podobieństwa i dzięki temu umożliwiają stworzenie odpowiednich algorytmów określających podobieństwo genomowe między porównywanymi izolatami. Główną zaletą tego typu analiz jest brak konieczności przeprowadzania pełnego składania genomu oraz jego porównywania do sekwencji referencyjnej, co w porównaniu do innych wariantów analiz sprawia, że metoda jest relatywnie prostsza w realizacji. Dużą zaletą jest także jej szybkość wykonywania [29].

6.2. SNP

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) polega na występowaniu punktowych, jednonukleotydowych różnic pomiędzy izolatami w sekwencji DNA. Stosując analizy SNP, odczyty uzyskane podczas sekwencjonowania zostają

porównywane do genomu referencyjnego. SNP zostaje wykryty w miejscu, w którym jeden nukleotyd analizowanego izolatu różni się od nukleotydu występującego w tym samym miejscu w sekwencji referencyjnej [40]. Występowanie dużej ilości sekwencji repetytywnych może utrudnić przeprowadzanie analiz SNP, w wyniku możliwego błędnego składania przez asembler bardzo podobnych sekwencji w jedną uśrednioną sekwencję.

Uzyskanie wiarygodnych, faktycznie występujących w danej sekwencji mutacji punktowych jest problematyczne, bowiem różnice w nukleotydach analizowanych sekwencji mogą być spowodowane błędami powstałymi przy sekwencjonowaniu, uzależnionymi od zastosowanej technologii, metodyki i chemii używanej do przygotowania biblioteki czy nawet algorytmu składania sekwencji. W związku z tym, analiza wykorzystująca porównanie sekwencji wytwarzanych różnymi technologiami jest obarczona dużym ryzykiem wystąpienia fałszywych SNP.

Proces filtrowania artefaktów może zniwelować liczbę błędów powstałych na etapie analizowania sekwencji. Można to zrobić stosując przeznaczone do tego odpowiednie algorytmy, analizujące m.in. takie parametry jak jakość odczytu danego nukleotydu, czy odległość (zagęszczenie) między kolejnymi mutacjami punktowymi. W związku z tym proces filtrowania artefaktów może być zdecydowanie skuteczniejszy w przypadku zastosowania jako sekwencji referencyjnej izolatu blisko spokrewnionego z analizowanym [16]. Z tego też powodu do analiz typu SNP powinny być stosowane pliki w formacie FASTQ zawierające informacje o jakości każdego odczytu, a nie złożone w formacie pliki FASTA.

Porównanie kilku izolatów do tego samego genomu referencyjnego może służyć do ustalania podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi drobnoustrojami. W miarę postępu technologii sekwencjonowania oraz ciągłego wzrostu liczby dostępnych genomów referencyjnych możliwe jest, że w przyszłości filtrowanie artefaktów i uzyskiwanie wiarygodnych analiz stanie się mniej problematyczne.

6.3. wgMLST

W tradycyjnym MLST analizuje się sekwencję zazwyczaj 7 określonych fragmentów genów metabolizmu podstawowego. Zakres tej analizy (liczba analizowanych *locus*) w przypadku danych WGS może być dowolnie rozszerzana. Umożliwiło to zapoczątkowanie prowadzenia analiz w odniesieniu do całego genomu – wgMLST (whole genome Multi-Locus Sequence Typing).

Kluczową decyzją jaką należy podjąć przy analizach wgMLST jest wybór odpowiedniego zbioru genów, używanego do przeprowadzania analizy. Pierwszy zestaw genów, który można zastosować, to tzw. genom rdzeniowy (core genome), czyli zbiór genów obecnych u wszystkich szczepów danego gatunku. Możliwe jest także rozszerzenie analizy uwzględniającej zestaw wszystkich genów zidentyfikowanych w obrębie badanego izolatu – genom rdzeniowy z genami dodatkowymi (analiza pełnogenomowa, whole genome). W najszerszej wersji analizy możliwe jest wykorzystanie zbioru wszystkich genów zidentyfikowanych w obrębie danej jednostki taksonomicznej, czyli pangenomu (pangenome). Ponieważ zbiór ten zawiera także geny, które są wynikiem procesu horyzontalnego transferu, nie jest uznawany za wiarygodny w analizach. W zależności od wyboru odpowiedniego zbioru *loci*, możliwe jest stosowanie metod cgMLST (core genome MLST), wgMLST (whole genome MLST), pgMLST (pangenome MLST) lub analiz niestandardowych, zawierających dowolną liczbę genów. Przykładowe wielkości genomów rdzeniowych, dodatkowych i pangenomów, mogące mieć zastosowanie w analizach MLST, zostały przedstawione w tabeli II.

Podobnie jak ma to miejsce w klasycznym 7 genowym MLST, allele analizowane przy wgMLST są identyfikowane przy pomocy bazy danych sekwencji odpowiednich genów. Zdefiniowane *loci* zostają porównane

Tabela II
Przykładowe wielkości genomów rdzeniowych, dodatkowych (akcesorycznych) oraz pangenomów

Gatunek	Wielkość pełnego genomu (Mb)	Ilość genów			
		Pełny genom	Genom rdzeniowy	Genom akcesoryczny	Pangenom
Escherichia coli/Shigella	5 400	4 300	2 513	14 837	17 380
Mycobacterium tuberculosis	4 400	4 000	2 891	1 141	4 032
Campylobacter jejuni/coli	1 900	1 650	1 343	2 179	3 529
Legionella pneumophila	3 400	2 930	1 521	4 249	5 777
Klebsiella pneumoniae	5 700	5 200	634	19 086	19 729
Salmonella enterica	4 900	4 400	3 002	12 865	15 874
Clostridium difficile	4 300	3 760	1 999	6 713	8 745

Na podstawie danych z algorytmów opracowanych przez Applied Matchs wykorzystane w programie BioNumerics

do danego *locus* zawartego w znanej sekwencji. Baza danych zawiera wszystkie możliwe allele występujące w każdym *locus* dotychczas poznanych izolatów. Do każdej z poszczególnych sekwencji danego allelu przyporządkowany zostaje unikalny identyfikator. Przeprowadzenie kompletnej analizy wymaga jedynie porównania profilu allelicznego izolatu z dostępną bazą danych. Dlatego też taki proces odbywa się bez bezpośredniego użycia genomu referencyjnego.

W odróżnieniu od analiz SNP, pełnogenomowe MLST znajduje zastosowanie tylko przy analizach regionów kodujących. Dzięki temu, niejako mimochodem, stosowane jest filtrowanie mutacji, które w rejonach międzygenowych mogą zachodzić w sposób zupełnie chaotyczny. Możliwe jest również występowanie *loci*, które ze względu na złą jakość uzyskanych danych sekwencyjnych, nie zostaną zidentyfikowane w analizowanym izolacie. W konsekwencji zmniejsza to poprawność analizy podobieństwa genetycznego izolatów określanego na podstawie wgMLST [16].

Wydajność tej analizy wraz z możliwością wprowadzenia usystematyzowanej nomenklatury sprawia, że wgMLST w chwili obecnej jest najlepszym pretendentem przy wprowadzaniu techniki WGS do rutynowych analiz, szczególnie analiz międzylaboratoryjnych [40].

7. Trudności analiz WGS

7.1. Proces przetwarzania danych

Jednym z głównych problemów występujących na etapie składania genomu *de novo* jest brak możliwości uzyskania w pełni złożonego genomu przy pomocy technologii sekwencjonowania obecnie powszechnie stosowanych. Efektem końcowym jest zatem pewna liczba kontigów (zazwyczaj 50–100 w dobrej jakości sekwencjonowaniu) składających się na pełen genom. Przyczyną tego jest mała długość pojedynczego odczytu, która uniemożliwia pełne pokrycie sekwencji repetytywnych wraz z sekwencjami je flankującymi, a co za tym idzie odpowiednie umiejscowienie ich w kompletnej sekwencji genomu. Postęp technologii sekwencjonowania, w szczególności w kwestii uzyskiwanych długości odczytów, być może umożliwi w przyszłości otrzymanie bardziej kompletnych genomów, których składanie będzie mogło się odbywać w rutynowych badaniach laboratoryjnych. Do niedawna, chcąc w pełni złożyć genom do jednej, liniowej sekwencji, należało łączyć kontigi powstałe po analizie WGS za pomocą sekwencjonowań sekwencji flankujących z zastosowaniem metody Sangera. Obecnie częściej stosowaną strategią jest łączenie np. danych uzyskanych z Illuminy (zapewniających wysokie pokrycie sekwencji) z danymi uzyskanymi z zastosowaniem technologii Nanopore (zapewniających bardzo długie odczyty) [34]. Takie podejście pozwala również skuteczniej wyodrębnić sekwencje plazmidowe oraz sekwencje repetytywne (bez uśredniania ich sekwencji).

Drugim dużym problemem jest występowanie różnego rodzaju błędów odczytu i artefaktów przy zastosowaniu różnej platformy sekwencjonowania, czy także różnej metodyki konstruowania biblioteki [21]. Różne jest także funkcjonowanie dostępnych na rynku algorytmów składających genom. Każdy z nich posiada swoje indywidualne właściwości, co przyczynia się do otrzymywania odmiennych wyników w procesie składania genomu i może się przekładać na uzyskanie niekompatybilnych wyników.

W zależności od rodzaju stosowanej analizy istotne może być wybranie odpowiedniego genomu referencyjnego. Taki genom powinien być w pełni zsekwencjonowany i przedstawiać sekwencję najbardziej zbliżoną do sekwencji analizowanego izolatu [15]. Pozwala to na zmapowanie uzyskanych kontigów (np. przy analizach typu resekwencjonowanie), identyfikację *loci*, a nawet adnotacje zidentyfikowanych sekwencji kodujących, obecnych zarówno w sekwencji referencyjnej, jak i w analizowanym izolacie. W celu zmniejszenia liczby niewykrytych *loci* możliwe jest użycie jako sekwencji odniesienia dowolnej sekwencji częściowo złożonego genomu blisko spokrewnionego izolatu [16].

Innym istotnym problemem związanym z przejściem na analizy pełnogenomowe jest brak kompatybilności wstecznej. Zarówno dane pochodzące z PFGE, jak i niektóre dane MLVA (jeśli wielkość rejonu VNTR jest dłuższa niż długość pojedynczego odczytu), nie mogą być wyekstrahowane z aktualnych danych WGS. W celu uzyskania odpowiednich długości fragmentów restrykcyjnych potrzebny jest w pełni złożony genom i zlikwidowanie problemu z analizą sekwencji repetytywnych. W przyszłości możliwe wydaje się przewidywanie pełnych danych MLVA, jednak pod warunkiem posiadania odczytów o odpowiedniej długości. W przypadku PFGE, nawet przy dostępności w pełni złożonego genomu, który pozwoli uzyskać odpowiednie długości fragmentów restrykcyjnych, porównywanie wyników z rzeczywistym profilem żelowym będzie przysparzało licznych problemów. Należy bowiem pamiętać o pewnej dozie subiektywizmu występującego podczas interpretacji żelu [16].

7.2. Przechowywanie i udostępnianie danych

W zależności od liczby zsekwencjonowanych izolatów, przechowywanie i udostępnianie danych może być utrudnione, zarówno pod względem technicznym, jak i pod względem kosztów. Sekwencjonowanie oraz przechowywanie, na przykład 10 000 odczytów z sekwencjonowania pałeczek *Salmonella*, potrzebuje

około 5 terabajtów wolnego miejsca. Biorąc pod uwagę wykonanie kopii zapasowej danych, liczba ta ulega podwojeniu [16]. Stąd też istotny jest format przechowywanych danych. Udostępnianie surowych plików dostarcza cennych informacji, m.in. o jakości odczytów. Tego typu dane mogą również zostać w przyszłości złożone z wykorzystaniem innych narzędzi informatycznych dla zachowania spójności analizy (np. korzystając z tego samego asemblera). Z kolei przechowywanie złożonych kontigów wydaje się prostsze technicznie (pojedyncza sekwencja ma wielkość jedynie ok. 4–5 MB), jednak w ten sposób utracone zostają bardzo istotne dane z przebiegu procesu sekwencjonowania.

Udostępnianie informacji również stwarza wiele problemów technicznych. Wysyłanie przez internet kilkudziesięciu plików z procesu sekwencjonowania pojedynczego izolatu jest czasochłonne. Potrzebne są zatem alternatywne rozwiązania, takie jak, na przykład serwery udostępniania danych lub przechowywanie danych w tzw. chmurze. Może się to jednak wiązać z dodatkowymi kosztami użytkowania [16].

7.3. Nomenklatura

Korzyści płynące ze stosowania sekwencjonowania pełnych genomów oraz coraz niższe koszty tego typu analizy sprawiają, że coraz więcej laboratoriów implementuje te metody do rutynowych badań. W celu umożliwienia jednolitego systemu nadzoru, konieczne jest stworzenie spójnych, wystandaryzowanych protokołów badawczych. Jednakże ekstrakcja danych użytecznych w nadzorze zdrowia publicznego z danych pełnogenomowych sprawia wciąż wiele problemów [17]. Jednym z wyzwań jest ustalenie spójnej nomenklatury, pozwalającej skutecznie i czytelnie charakteryzować analizowane izolaty. Wynika to głównie ze złożoności problemu, potrzeby globalnego konsensusu oraz kosztów wdrożenia centralnej bazy danych, wymagającej częstej aktualizacji.

W opinii opublikowanej przez panel ekspertów z takich organizacji jak ECDC, CDC oraz PulseNet International [40], a także w raporcie grupy eksperckiej ECDC [16], sugerowane jest rozwiązanie oparte o analizę wgMLST. Nomenklatura ta w najprostszej wersji zawierałaby definicje wszystkich *loci* zawartych w metodzie MLST, a także powiązania między allelami a konkretną sekwencją. Składałyby się one z unikalnych identyfikatorów, które odpowiadałyby określonej sekwencji allelu dla predefiniowanego *locus* w genomie. Przyporządkowanie identyfikatorów alleli pozwoliłoby uzyskać dane dla każdego *locus*. Uzyskane profile stanowiłyby odzwierciedlenie podobieństwa genetycznego poszczególnych izolatów. Niestety taka wersja nomenklatury byłaby bardzo niepraktyczna i nieczytelna przez konieczność określania numeru allelu dla setek *loci*.

Ważne jest, aby ustalona nomenklatura mogła być porównywana między laboratoriami. Metoda wgMLST potrzebuje więc utworzenia międzynarodowej bazy alleli. Baza danych powinna zawierać zarówno w pełni złożone genomy, jak i odczyty uzyskane bezpośrednio w procesie sekwencjonowania. Powinna mieć także możliwość wprowadzania alleli zidentyfikowanych przy pomocy lokalnej bazy danych. A zatem i dużą przepustowość, w celu obsługiwania i przyjmowania nowych danych przesyłanych przez organizacje z całego świata [40].

8. Potencjalne kierunki rozwoju

Ważnym aspektem wydaje się być wdrożenie analiz WGS we wszystkich centralnych laboratoriach zdrowia publicznego (takich jak laboratoria referencyjne), zastępując tym samym niektóre z dotychczasowo używanych metod fenotypowych i techniki typowania molekularnego.

Stosowanie analiz WGS może być z powodzeniem stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej, w analizach epidemiologicznych (np. na potrzeby analizy ognisk zakażeń) czy w badaniach filogenetycznych. Tym samym metoda ta może stanowić podstawowe narzędzie molekularnego nadzoru epidemiologicznego. Poza tym, istnieją inne potencjalne zastosowania danych WGS, w tym przewidywanie właściwości fenotypowych, takich jak oporność, zjadliwość czy serotyp. Dzięki temu, konieczność stosowania metod fenotypowych, przynajmniej w celu ochrony zdrowia publicznego, mogłaby zostać znacząco zredukowana.

W ostatnich latach koszt całkowitego sekwencjonowania genomów uległ znacznej redukcji, a technologia stała się jeszcze bardziej przystępna przy rutynowym zastosowaniu, co umożliwia wykorzystanie WGS w analizach na całym świecie. Ponadto, w niedalekiej przyszłości możliwe jest również zwiększenie szybkości sekwencjonowania genomu bakteryjnego z kilku dni do paru godzin. Zalety te pozwoliłyby na rutynowe zastosowanie analiz w diagnostyce mikrobiologicznej. Jednakże przed wdrożeniem analiz WGS w rutynowych badaniach należy ocenić ich jakość poprzez wykorzystanie w charakterystyce dobrze opisanych różnych ognisk, a także w porównaniu do klasycznych metod typowania [51].

Korzyści płynące ze stosowania sekwencjonowania pełnych genomów przyspieszają decyzję placówek zdrowia publicznego o jego zastosowaniu w rutynowych analizach. Mimo problemów z opracowaniem nomenklatury pojawiły się rekomendacje dotyczące wprowadzania odpowiednich przepisów normujących WGS. W celu umożliwienia prowadzenia nadzoru w czasie rzeczywistym, PulseNet International

planuje ujednolicić typowanie techniką WGS oparte na wgMLST. Technika ta mogłaby zapewnić optymalną rozdzielczość, zapewniając jednocześnie jednoznaczną nomenklaturę. Ponadto, dla większości placówek zdrowia publicznego analiza ta byłaby efektywna względem wymogów technicznych, co być może pozwoli na zastosowanie jej w rutynowych badaniach laboratoryjnych, co w rezultacie doprowadziłoby do znacznej redukcji kosztów [40].

9. Podsumowanie

Identyfikacja i określenie podobieństwa genetycznego bakterii odbywa się przy użyciu zarówno klasycznych metod fenotypowych, jak i nowocześniejszych metod opartych na biologii molekularnej. Ze względu na większą dokładność i powtarzalność, w większości przypadków metody genetyczne okazują się być lepszym narzędziem niż metody fenotypowe. Sekwencjonowanie kwasu nukleinowego i inne techniki typowania o dużej przepustowości stają się coraz bardziej popularne, a dzięki ich wysokiej rozdzielczości są idealnym narzędziem do analiz porównawczych patogenów bakteryjnych. Używając technologii sekwencjonowania nowej generacji możliwe stało się również zbadanie kompletnych lub prawie kompletnych genomów izolatów bakteryjnych.

W chwili obecnej coraz większe znaczenie mają metody polegające na analizie sekwencji pełnego genomu. Analizy WGS nadają się do wprowadzenia w rutynowych badaniach laboratoryjnych oraz do zastąpienia dotychczas stosowanych metod sekwencjonowania DNA, takich jak PFGE, MLVA lub klasyczne sekwencjonowanie Sangera. Ponieważ analizy WGS dostarczają ogromnej ilości danych (o wiele więcej niż przy użyciu innych metod molekularnych), pozwoliłyby na uzyskanie dokładnych informacji na temat każdej sekwencji zawartej w genomie. Wysoka rozdzielczość analiz WGS może w czasie rzeczywistym dostarczyć informacje dotyczące zarówno pochodzenia bakterii oraz dróg ich transmisji, jak i biologicznych właściwości, takich jak serotyp. Umożliwia również identyfikację genów wirulencji lub genów oporności antybiotykowej. Dzięki temu, analiza porównawcza całego genomu może stać się główną metodą typowania, stosowaną zarówno do celów wczesnego wykrywania ognisk, jak i do monitorowania dynamiki rozprzestrzeniania się danego patogenu. Ponieważ rozwój technik biologii molekularnej, a zwłaszcza technik sekwencjonowania DNA i analiz pełnogenomowych następuje w bardzo szybkim tempie, trudno jest jednak precyzyjnie przewidzieć przyszłość w dziedzinie metod typowania molekularnego.

Źródło finansowania: Praca finansowana przez Narodowe Centrum Nauki, decyzja numer UMO-2015/17/N/NZ6/03517.

Piśmiennictwo

1. Aanensen D.M., Spratt B.G.: The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* **33**, 728–733 (2005)
2. Adzitey F., Huda N., Ali G.R.R.: Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech.* **3**, 97–107 (2013)
3. Applied Maths: Five more wgMLST schemes available, 19.05. 2017, http://www.applied-maths.com/news/five-more-wgmlst-schemes-available (10.10.2017)
4. Applied Maths: Six more wgMLST schemes available, 30.11. 2016, http://www.applied-maths.com/news/six-more-wgmlst-schemes-available (10.10.2017)
5. Baj J., Markiewicz Z. Biologia molekularna bakterii. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2015, s. 11.
6. Belkum A.: Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable numer of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **49**, 22–27 (2007)
7. Brown T.A. Genomy. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2012, s. 121.
8. Brzostek A., Dziadek J.: Molekularne metody genotypowania prątków gruźlicy w dochodzeniach epidemiologicznych transmisji zakażeń. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **80**, 193–197 (2012)
9. Canard B., Sarfati R.S.: DNA polymerase fluorescent substrates with reversible 3'-tags. *Gene,* **148**, 1–6 (1994)
10. Centers for Disease Control and Prevention: Multiple locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html (10.10.2017)
11. Chen Y., Zhang W., Knabel S.J.: Multi-virulence-locus sequence typing clarifies epidemiology of recent listeriosis outbreaks in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5291–5294 (2005)
12. Compare: About Compare, http://www.compare-europe.eu/about (10.10.2017)
13. Databases hosted on PubMLST, https://pubmlst.org/databases/ (10.10.2017)
14. Edwards A., Debbonaire A.R., Sattler B., Mur L.A.J., Hodson A.J.: Extreme metagenomics using Nanopore DNA sequencing: a field report from Svalbard, 78°N. *BioRxiv*, 073965 (2016)
15. Edwards D.J., Holt K.E.: Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microb. Inform. Exp.* DOI: 10.1186/2042-5783-3-2 (2013)
16. European Centre for Disease Prevention and Control: Expert Opinion on the introduction of next-generation typing methods for food- and waterborne diseases in the EU and EEA. Stockholm: ECDC, DOI: 10.2900/453641 (2015)
17. European Centre for Disease Prevention and Control: Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. Stockholm: ECDC, DOI: 10.2900/12442 (2016)
18. European Centre for Disease Prevention and Control: Laboratory standard operating procedure for MLVA of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Stockholm: ECDC, DOI:10.2900/56328 (2011)
19. Fleischmann R.D., Venter J.C. i wsp. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, **269**, 496–512 (1995)
20. Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, **270**, 397–403 (1995)
21. Frey K.G., Herrera-Galeano J.E., Redden C.L., Luu T.V., Servetas S.L., Mateczun A.J., Mokashi V.P., Bishop-Lilly K.A.: Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. *BMC Genomic*s, DOI: 10.1186/1471-2164-15-96 (2014)
22. Gierczyński R., Golubov A., Neubauer H., Pham J.N., Rakin A.: Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat

analysis for *Yersinia enterocolitica* subsp. *Palearctic* and its application to bioserogroup 4/O3 subtyping. *J. Clinic. Microbiol.* **45**, 2508–2515 (2007)
23. Illumina: An introduction to Illumina next-generation sequencing technology for microbiologists, https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/sequencing_introduction_microbiology.pdf (10.10.2017)
24. Illumina: An introduction to next-generation sequencing technology, https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf (10.10.2017)
25. Illumina: Nextera DNA library preparation kits, https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_nextera_dna_sample_prep.pdf (10.10.2017)
26. Kotetishvili M., Stine O.C., Chen Y., Kreger A., Sulakvelidze A., Sozhamannan S., Morris Jr.J.G.: Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. *J. Clinic. Microbiol.* **41**, 2191–2196 (2003)
27. Kotowska M., Zakrzewska-Czerwińska J.: Kurs szybkiego czytania DNA – nowoczesne techniki sekwencjonowania. *Biotechnologia*, **4**, 24–38 (2010)
28. Larsson J.T., Torpdahl M., Petersen R.F., Sorensen G., Lindstedt B.A., Nielsen E.M.: Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable numer of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill.* DOI: https://doi.org/10.2807/ese.14.15.19174-en (2009)
29. Leekitcharoenphon P., Nielsen E.M., Kaas R.S., Lund O., Aarestrup F.M.: Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS ONE* **9**, e87991, (2014)
30. Li W., Raoult D., Fournier P.E.: Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 892–916 (2009)
31. Lienemann T., Kyyhkynen A., Halkilahti J., Haukka K., Siitonen A.: Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA. *BMC Microbiol.* DOI: 10.1186/s12866-015-0467-8 (2015)
32. Lindstedt B.A., Åkerström S. i wsp.: Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. *Euro Surveill.* DOI: 10.2807/ese.18.04.20385-en (2013)
33. MacCannell D.: Bacterial strain typing. *Clin. Lab. Med.* **33**, 629–650 (2013)
34. Madoui M., Engelen S., Cruaud C., Belser C., Bertrand L., Alberti A., Lemainque A., Wincker P., Aury J.M.: Genome assembly using Nanopore-guided long and error-free DNA reads. *BMC Genomics,* DOI: 10.1186/s12864-015-1519-z (2015)
35. Maiden M.C.J., Spratt B.G. i wsp.: Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3140–3145 (1998)
36. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Szlachetka M.: Dylematy z koncepcją i definicją gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* **47**, 177–182 (2008)
37. Margulies M., Rothberg J.M. i wsp.: Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature,* **437**, 376–380 (2005)
38. Maxam A.M., Gilbert W.: A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 560–564 (1977)
39. MLST, http://www.mlst.net/ (10.10.2017)
40. Nadon C., Walle I.V., FWD-NEXT Expert Panel i wsp.: PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Euro Surveill.*, DOI: http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30544 (2017)
41. NASA: Sequencing the station: investigation aims to identify unknown microbes in space, 25.04.2017, https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/news/genes_in_space3 (10.10.2017)
42. NCBI: Genome, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome (10.10.2017)
43. Oxford Nanopore Technologies: How it works, https://nanoporetech.com/how-it-works (10.10.2017)
44. Oxford Nanopore Technologies: Portable, real-time biological analyses, https://nanoporetech.com/products/minion (10.10.2017)
45. Oxford Nanopore Technologies: VolTRAX, https://nanoporetech.com/products/voltrax (10.10.2107)
46. Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A.: Sequencing technologies and genome sequencing. *J. Appl. Genetics,* **52**, 413–435 (2011)
47. Pareek C.S.: An overview of next-generation genome sequencing platforms (w) Next-generation Sequencing: Current Technologies and Applications. red. Xu J., Caister Academic Press, 2014, s. 1–24
48. Prober J.M., Trainor G.L., Dam R.J., Hobbs F.W., Robertson C.W., Zagursky R.J., Cocuzza A.J., Jensen M.A., Baumeister K.: A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science,* **238**, 336–341 (1987)
49. Ronaghi M., Uhlén M., Nyrén P.: A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, **281**, 363–365 (1998)
50. Sabat A.J., Budimir A., Nashev D., Sá-Leão R., van Dijl J.M., Laurent F., Grundmann H., Friedrich A.W.: Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* DOI: https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20380-en (2013)
51. Salipante S.J., SenGupta D.J., Cummings L.A., Land T.A., Hoogestraat D.R., Cookson B.T.: Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1072–1079 (2015)
52. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463–5467 (1977)
53. Singh A., Goering R.V., Simjee S., Foley S.L., Zervos M.J.: Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 512–530 (2006)
54. Struelens M.J. and the Members ESGEM, ESCMID: Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* **2**, 2–11 (1996)
55. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233–2239 (1995)
56. Urwin R., Maiden M.C.J.: Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* **11**, 479–487 (2003)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 194–202
http://www.pm.microbiology.pl

BIOCHEMICZNE METODY OCENY RÓŻNORODNOŚCI FUNKCJONALNEJ I STRUKTURALNEJ MIKROORGANIZMÓW GLEBOWYCH

Karolina Furtak*, Anna M. Gajda

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy (IUNG – PIB)

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w lutym 2018 r.

Streszczenie: Mikrobiom glebowy składa się z wysoce zróżnicowanych pod względem strukturalnym oraz funkcjonalnym grup mikroorganizmów. Stanowi on obiekt licznych badań od wielu lat, jednakże wciąż pozostaje nie do końca poznany. Wiadome jest, że mikroorganizmy glebowe odgrywają główną rolę w procesach biogeochemicznych. Znajomość ich różnorodności strukturalnej i funkcjonalnej pozwala zatem na ocenę stanu środowiska glebowego, co jest niezwykle istotne dla agronomii oraz ekologii. Działalność rolnicza oraz przemysłowa człowieka powoduje zmiany w aktywności gleby, które należy monitorować. W badaniach nad aktywnością i różnorodnością mikrobiologiczną gleby można wyróżnić wiele metod badawczych opracowywanych i udoskonalanych przez naukowców z całego świata. Metody biochemiczne stosowane w celu analizy aktywności mikrobiologicznej polegają na określeniu zdolności mikroorganizmów do syntezy, asymilacji bądź rozkładu określonych związków chemicznych, a także na analizie komponentów komórek drobnoustrojów. Omówiono w niniejszej pracy metody badawcze, które umożliwiają analizę zarówno funkcjonalności mikroorganizmów, jak i ich strukturalnego zróżnicowania.

1. Wprowadzenie. 2. Oznaczenia aktywności enzymatycznej. 3. Technika CLPP. 4. Analiza profili kwasów tłuszczowych. 5. Analiza profili białkowych. 6. Podsumowanie

Biochemical methods for the evaluation of the functional and structural diversity of microorganisms in the soil environment

Abstract: Soil microbiome is composed of groups of microorganisms which are structurally and functionally very different. For many years soil microbiome has been the subject of numerous studies, but still is not fully recognized. It is well known that soil microorganisms play a key role in biogeochemical processes. Knowledge of their structural and functional diversity makes it possible to assess the condition of the soil environment, which is extremely important for agronomy and ecology. The agricultural and industrial activities of humans cause changes in soil activity, which should be monitored. There are many different research methods developed to analyze soil activity and microbiological soil diversity and refined by researchers from around the world in. Biochemical methods used to analyze microbial activity are based on the determination of the ability of microorganisms to synthesize, assimilate or decompose specific chemical compounds, as well as on the analysis of microbial cell components. This study presents the research methods used for the analysis of both: the functionality of microorganisms and their structural diversity.

1. Introduction. 2. Determination of enzymatic activity. 3. CLPP technique. 4. Analysis of fatty acid profiles. 5. Analysis of protein profiles. 6. Summary

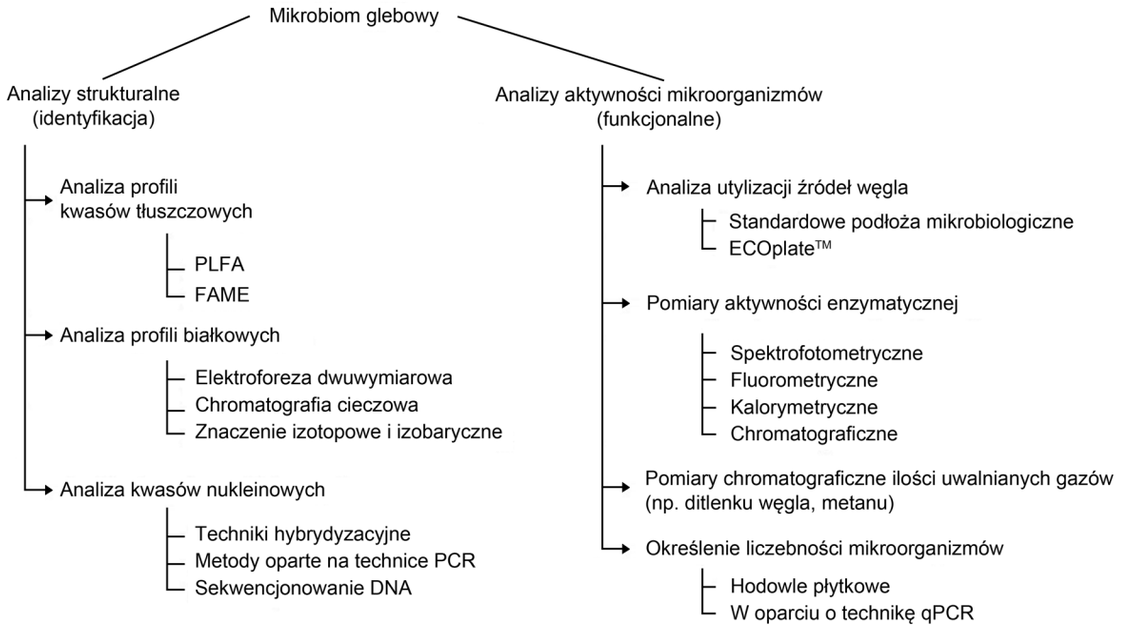
Słowa kluczowe: aktywność enzymatyczna, aktywność mikrobiologiczna, analiza kwasów tłuszczowych, analiza proteomiczna, Biolog ECOplate
Key words: Biolog ECOplate, enzymatic activity, fatty acid analysis, microbiological activity, proteomic analysis

1. Wprowadzenie

Aktywność mikrobiologiczna środowiska glebowego wskazuje bezpośrednio na jakość gleby. Mikroorganizmy glebowe są bowiem odpowiedzialne za przebieg różnych procesów biogeochemicznych, uczestniczą w mineralizacji materii organicznej oraz są odpowiedzialne za obieg pierwiastków biogennych w środowisku [49]. Enzymy pochodzenia drobnoustrojowego, które występują w środowisku glebowym uczestniczą w procesach biochemicznych, takich jak: synteza białek, synteza kwasów nukleinowych, hydroliza złożonych związków azotu organicznego, dezaminacja aminokwasów [27], przemiany organicznych form fosforu [8] oraz hydroliza estrów siarczanowych [11]. Procesy te, mają zasadnicze znaczenie w środowisku, ponieważ dzięki nim następuje uwalnianie i udostępnianie roślinom substancji odżywczych.

Wiedza na temat aktywności oraz różnorodności mikroorganizmów glebowych pozwala na ocenę stanu środowiska glebowego, co jest użyteczne w rolnictwie i ekologii. Działania człowieka w środowisku naturalnym, w tym intensyfikacja rolnictwa, stosowanie środków ochrony roślin i zanieczyszczenia przemysłowe zmieniają bowiem aktywność enzymatyczną gleb [34]. Ingerencje człowieka mają także wpływ na różnorodność mikrobiologiczną gleby, co może wpływać negatywnie na wielofunkcyjność oraz trwałość tego środo-

* Autor korespondencyjny: Karolina Furtak, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy (IUNG – PIB); ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel.: 81 478 69 61; e-mail: kfurtak@iung.pulawy.pl



Rys. 1. Przykładowe metody analizy strukturalnej i funkcjonalnej mikrobiomu glebowego
Opracowanie własne na podstawie [17, 25].

wiska [15]. W konsekwencji, zmiany w mikrobiomie mogą wpływać na produktywność i różnorodność roślin [44, 50].

W badaniach nad aktywnością oraz różnorodnością mikrobiologiczną gleb można wyróżnić szereg metod kategoryzowanych w wiele grup w zależności od celu analizy, czy rodzaju wykorzystanych technik (Rys. 1).

Metody biochemiczne stosowane w analizie aktywności mikrobiologicznej polegają na określeniu zdolności mikroorganizmów do syntezy, asymilacji lub rozkładu określonych związków chemicznych. Konwencjonalne techniki biochemiczne polegają na obserwacji zmian zachodzących podczas przeprowadzanych reakcji chemicznych. Rezultatem może być zmiana zabarwienia pożywki, wytworzenie gazu, bądź zmiana barwy badanego roztworu. Metody biochemiczne umożliwiają analizę aktywności, a także identyfikację taksonomiczną mikroorganizmów również w oparciu o oznaczenie produktów ich metabolizmu lub wybranych związków wchodzących w skład struktur komórkowych.

W niniejszej pracy zaprezentowane zostały wybrane metody biochemiczne wykorzystywane aktualnie w badaniach różnorodności strukturalnej i funkcjonalnej mikroorganizmów glebowych.

2. Oznaczenia aktywności enzymatycznej

W środowisku glebowym występuje wiele enzymów, których pochodzenie związane jest z drobnoustrojami. Enzymy uczestniczą w syntezie białek i kwasów nukleinowych, stanowią także elementy łańcuchów obiegu węgla, azotu czy fosforu. Oznaczenia aktywności enzymów glebowych cieszą się dużym zainteresowaniem w mikrobiologii, biochemii, a także naukach rolniczych. Intensyfikacja produkcji w rolnictwie powoduje poszukiwanie wskaźników, mikrobiologicznych i biochemicznych, które mogłyby służyć, jako indykatory środowiska glebowego. W opinii naukowców aktywność enzymatyczna w połączeniu z innymi właściwościami gleb dostarcza informacji wystarczających do oceny jakości gleby [1, 13, 15]. Aktywność enzymatyczna zależy od rodzaju mikroorganizmów, ich żywotności, właściwości fizyko-chemicznych gleby oraz czynników antropogenicznych, jak np. nawożenia, sposób uprawy [33]. Badając próbki glebowe należy jednak mieć na uwadze, że uzyskany wynik może obejmować także aktywność enzymów obecnych w sporach grzybowych oraz endosporach bakterii, korzeniach i nasionach roślin, które nie są związane bezpośrednio z aktywnością żywych mikroorganizmów. Określenie aktywności enzymatycznej może odbywać się poprzez ilościowe oznaczenie produktu reakcji enzymatycznej (np. jonów azotanowych) lub na obniżeniu ilości dostępnego substratu (na który działa wybrany enzym).

Wśród metod służących do oznaczania aktywności enzymatycznej wyróżnia się:

- metody spektrofotometryczne,
- metody fluorometryczne,
- metody kolorymetryczne,
- metody chemiluminescencyjne,
- metody radiometryczne,
- metody chromatograficzne.

Tabela I
Wybrane enzymy mikroorganizmów glebowych wraz z ich funkcją oraz najczęściej stosowaną metodą oznaczenia

Enzym	Funkcja w glebie	Metoda oznaczania	Piśmiennictwo
Dehydrogenazy (EC 1.2.1)	Stanowią element komórkowego łańcucha oddechowego oraz katalizują reakcje utleniania i redukcji.	Kolorymetryczna z zastosowaniem 2,3,5-trifenylotetrazoliowy chlorek (TTC) lub 2-p-jodofenylo-3-p-nitrofenylo-5-fenylo-tetrazoliowy chlorek) (INT)	[2, 12]
Fosfatazy (EC 3.1.3)	Katalizują przemiany organicznych form fosforu w nieorganiczne fosforany, które są przyswajalne dla roślin.	Kolorymetryczna z zastosowaniem p-nitrofenylofosforanu (PNP)	[48]
Proteazy (Klasa EC 3.4)	Katalizują hydrolizę białek do mniej złożonych związków – polipeptydów i aminokwasów poprzez rozerwanie wiązań peptydowych.	Kolorymetryczne oznaczenie ilości wolnych aminokwasów powstałych w wyniku hydrolizy białka (np. kazeninianu sodu)	[26]
Arylsulfataza (EC 1.3.6.1)	Katalizuje hydrolizę estrów siarczanowych poprzez rozszczepienie wiązania O-S oraz uczestniczy w obiegu siarki w glebie.	Kolorymetryczna z zastosowaniem siarczanu p-nitrofenylu potasu (PNS)	[47]
Ureaza (EC 3.5.1.5)	Katalizuje rozkład mocznika do amoniaku i CO_2.	Kolorymetryczna z zastosowaniem np. mocznika	[22]
Amidaza (EC 3.5.1.4)	Katalizuje hydrolizę amidów oraz podobnych związków kwasu węglowego z amoniakiem.	Kolorymetryczna z zastosowaniem np. formamidu, acetamidu	[10]
Dezaminaza (EC 3.5.4)	Katalizuje proces amonifikacji.	Kolorymetryczna z zastosowaniem np. 1,2-diamino-4-nitrobenzen	[23]

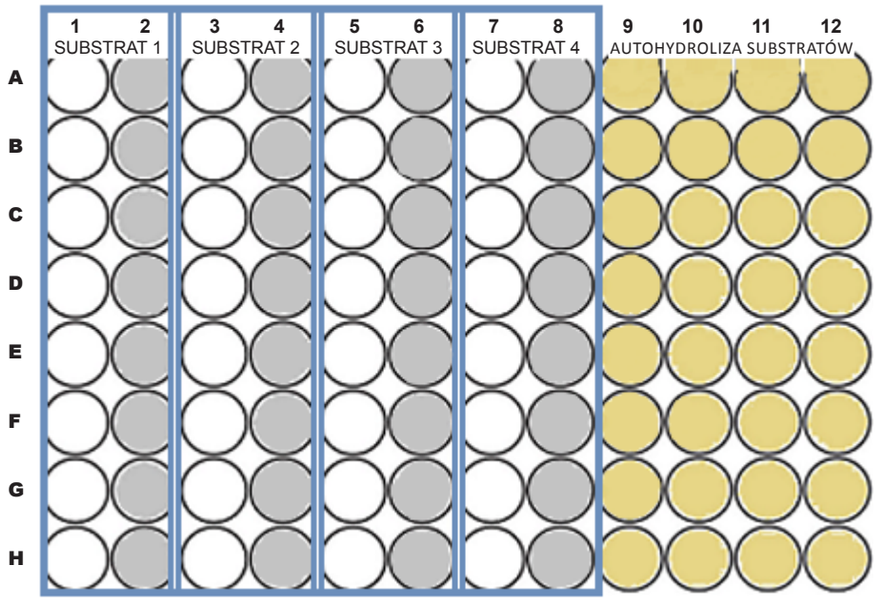
Najpowszechniej stosowane są połączenia technik kolorymetrycznych ze spektrofotometrycznymi. Metody spektrofotometryczne pozwalają na obserwowanie przebiegu reakcji biochemicznej poprzez pomiar zmiany ilości światła pochłanianego przez roztwór badany. W momencie, gdy światło znajduje się w zakresie fal widzialnych można empirycznie zaobserwować zmianę barwy roztworu i w takim przypadku mamy do czynienia z testem kolorymetrycznym. Niektóre enzymy występujące w środowisku glebowym oraz konwencjonalne metody ich oznaczania przedstawiono w Tabeli I.

Konwencjonalne metody oznaczenia aktywności enzymów glebowych nie są jednak całkowicie wiarygodne. Większość z nich jest pracochłonna oraz czasochłonna. Dodatkowo sprowadzają się do oznaczenia aktywności tylko jednego enzymu w danym czasie i w ograniczonej liczbie próbek. Trwają wprawdzie liczne badania poświęcone poszukiwaniu nowych, efektywnych akceptorów elektronów oraz bardziej wydajnych substratów [40], jednakże takie analizy zawsze będą obarczone znacznym ryzykiem błędu i licznymi ograniczeniami.

Spektrum aktywności enzymów badanych w glebach jest natomiast bardzo szerokie i stanowi przedmiot prac wielu naukowców. Stąd też istnieje ciągła potrzeba dalszych opracowań nowych metod badawczych. Zastosowanie czytnika mikropłytek i analizy fluorymetrycznej pozwala na analizę kilku enzymów w jednym czasie, przy równoległym ograniczeniu ilości analizowanej próbki. W konsekwencji możliwe jest obniżenie kosztów i czasu takiej analizy [3]. Opracowane dotychczas testy mikropłytkowe opierają się na wykorzystaniu różnych substratów oznaczonych, jako 4-metyloumbeliferony – MUF (4-Methylumbelliferyl). Dla przykładu warto podać fosforan 4-metyloumbeliferonu służący do oznaczania aktywności fosfataz oraz maślan 4-metyloumbeliferonu będący substratem dla esteraz i lipaz. Standardowy układ 96-dołkowej płytki zawiera rzędy z próbami badanymi i kontrolami dla każdej z nich (Rys. 2).

Na jednej płytce można dokonać pomiaru czterech różnych enzymów jednocześnie dla jednej próbki glebowej. Pozostałe cztery rzędy (nr 9–12) służą do oznaczenia autohydrolizy substratów enzymatycznych. W przypadku analizy większej ilości próbek w tym samym czasie, na kolejnych mikropłytkach nie trzeba sprawdzać autohydrolizy. Dodatkowo, należy natomiast przygotować jedną mikropłytkę zawierającą wzorce MUF z rosnącymi stężeniami w celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej. Analiza mikropłytek może polegać na pomiarze absorbancji, bądź fluorescencji. Pomiar fluorescencyjny jest bardziej odporny na zmętnienie próby, aczkolwiek jest ściśle zależny od temperatury i pH [3]. Czułość tej metody jest bardzo duża – czytnik pozwala na identyfikację pikomoli MUF w 200–300 µL badanego roztworu [39]. Wykorzystanie mikropłytek pozwala na analizę wielu, różnych enzymów pochodzenia glebowego, które mogą utylizować substraty MUF, co stwarza możliwość wielokierunkowej analizy środowiska.

Niektóre reakcje enzymatyczne wytwarzają światło, co można wykorzystać do wykrycia produktów. Metody wykorzystujące chemiluminescencję są bardzo czułe, jednak nie są zalecane do oznaczeń ilościowych, więc

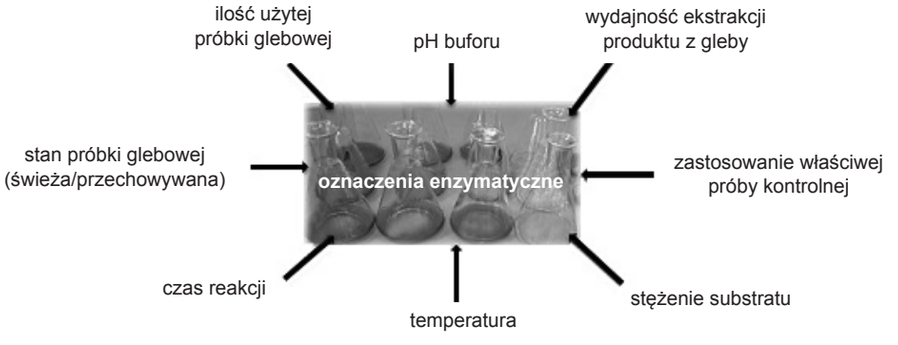


Rys. 2. Schemat mikropłytki do oznaczeń enzymatycznych z zastosowaniem czytnika płytek
Szare pola – miejsce na kontrolę; białe pola – miejsce na próbkę badaną; żółte pola – miejsce na substraty w celu oznaczenia ich autohydrolizy. Opracowanie własne na podstawie [3].

w przypadku enzymów glebowych i oceny ich aktywności nie dają one oczekiwanych rezultatów. Zarówno metody radiometryczne, jak i chromatograficzne nie są zaliczane do metod biochemicznych, jednakże są to techniki bardzo czułe i specyficzne stosowane w enzymologii. W przypadku badań radiometrycznych do znakowania enzymów najczęściej stosowanymi izotopami są ^{14}C, ^{32}P i ^{35}S. Wśród metod chromatograficznych zazwyczaj wykorzystywana jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography), bądź chromatografia cienkowarstwowa (TLC, Thin Layer Chromatography).

Warto pamiętać, że stosowanie samych enzymów, jako indykatorów aktywności mikrobiologicznej gleby wciąż jest niemożliwe. Wiąże się to przede wszystkim z tym, że analizy enzymatyczne określają potencjalną, a nie rzeczywistą aktywność enzymów, a dodatkowo wiele enzymów działa na zasadzie sprzężenia z innymi procesami, co jest często pomijane w badaniach. Kolejne utrudnienie stanowi złożoność środowiska glebowego oraz czułość enzymów na wiele czynników biotycznych i abiotycznych (Rys. 3).

Mimo wielu ograniczeń związanych z samymi metodami oraz złożoności przedmiotu badań, połączenie analiz aktywności enzymatycznej gleby z innymi, takimi jak: analizy molekularne, analiza funkcjonalna, czy oznaczeniami fizyko-chemicznymi gleby, pozwala na uzyskanie wieloaspektowego obrazu aktywności i funkcjonalności mikrobiomu glebowego. Główny cel badań nad glebą stanowi poszukiwanie indykatorów, które opisywałyby właściwie stan i jakość środowiska glebowego. Także wśród analiz aktywności mikrobiologicznej poszukuje się takich wskaźników. Mimo przeprowadzonych licznych doświadczeń i prób w tej dziedzinie oraz zgromadzonej wiedzy, cel sformułowania uniwersalnego wskaźnika jakości gleby pozostaje wciąż odległy.



Rys. 3. Przykładowe czynniki wpływające na pomiar aktywności enzymów mikroorganizmów glebowych
Opracowanie własne na podstawie [4].

3. Technika CLPP

Obok aktywności enzymatycznej w badaniach aktywności mikrobiologicznej środowiska glebowego wykorzystuje się metodę zwaną profilowaniem fizjologicznego poziomu populacji – CLPP (Community Level Physiological Profiling), która opiera się na wykorzystywaniu przez mikroorganizmy środowiskowe różnych źródeł węgla [51]. Metoda CLPP służy do oceny aktywności metabolicznej nie pojedynczych drobnoustrojów, ale całych populacji mikroorganizmów pochodzących z danego środowiska. Firma Biolog® wykorzystała zdolność drobnoustrojów do utylizacji różnych substratów i rozwinęła tę technikę tworząc 96-dołkowe płytki zawierające źródła węgla i barwnik [18]. Do badań próbek środowiskowych, w tym glebowych, stworzone zostały płytki o nazwie ECOplate™ zawierające 31 źródeł węgla w trzech powtórzeniach oraz wodę, jako próbkę kontrolną. Substraty te można sklasyfikować w pięć grup biochemicznych: (1) węglowodany, (2) kwasy karboksylowe, (3) aminy i amidy, (4) aminokwasy oraz (5) polimery (Tab. II).

Metoda oparta na ECOplate™ pozwala na badanie całych społeczności mikroorganizmów pochodzących z różnych próbek środowiskowych. Analiza opiera się na odczycie spektrofotometrycznym zmiany intensywności barwy redukującego się barwnika redoks – fioletu tetrazoliowego [21]. Wzrost mikroorganizmów na danym podłożu powoduje zmianę zabarwienia pożywki na fioletowy. Procedura analizy z wykorzystaniem ECOplate™ nie jest skomplikowana. Z próbki środowiskowej należy przygotować zawiesinę zawierającą badaną społeczność mikroorganizmów, a następnie zainokulować nią mikropłytkę i inkubować [14, 16]. Przygotowanie inokulum z próbki glebowej odbywa się w trzech etapach: (1) przygotowanie zawiesiny poprzez umieszczenie 1 g gleby w 99 ml sterylnego roztworu (sterylna woda, 0,9% NaCl, bufor Tris), (2) wytrząsanie próbek przez 20 minut w temperaturze pokojowej, (3) chłodzenie próbek w temperaturze 4°C przez 30 minut. Inkubację płytek prowadzi się w temperaturze optymalnej dla mikroorganizmów z danego środowiska. W przypadku próbek glebowych wynosi ona 25–27°C. Pierwsze zmiany zabarwienia, świadczące o zachodzącym w studzienkach metabolizmie są widoczne zaledwie po 24 h inkubacji. Jednakże, czas inkubacji jest uzależniony od rodzaju badanej próbki, a także wyników, jakie chce się uzyskać. Niektóre drobnoustroje wzrastają bardzo wolno, a pomiar ich metabolizmu może trwać do kilkunastu dni. Pomiary spektrofotometryczne dostarczają wielu wyników. Podstawowym parametrem, jaki otrzymuje się podczas analizy jest gęstość optyczna, OD (Optical Density), która odzwierciedla zagęszczenie komórek mikroorganizmów w studzience. Na jej podstawie wyliczane są wskaźniki takie jak: WCD (Well Color Development) oraz AWCD (Average Well Color Development) [14]. Ilość oraz złożoność otrzymanych wyników wymagają dokładnych analiz statystycznych [30]. Umożliwiają one sporządzenie krzywych logarytmicznych wzrostu mikroorganizmów, wyliczenie indeksu Shannon-Weaver (*H'*), czy indeksu jednorodności (*E*). Dzięki dużej ilości wyników możliwe jest oszacowanie metabolizmu mikroorganizmów, preferencji odnośnie źródeł węgla oraz różnorodności funkcjonalnej. Wśród testów firmy Biolog® są dostępne także inne płytki, m.in.:

- płytki do analizy bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich izolowanych z materiału klinicznego (GP/GN plates),
- płytki do analizy drożdży (YT plates),
- płytki do badania grzybów strzępkowych (FF plates),
- płytki do analizy mikroorganizmów beztlenowych (AN plates)
- płytki przeznaczone do identyfikacji bakterii bez ich różnicowania (GEN III plates).

Tabela II
Substraty umieszczone na płytce ECO

Węglowodany	Kwasy karboksylowe	Aminokwasy	Polimery	Aminy/amidy
Pirogronian metylu	Kwas D-glukozaminowy	L-arginina	Tween 40	Fenyloetylo-amina
D-celobioza	γ-lakton kwasu D-galaktonowego	L-asparagina	Tween 80	Putrescyna
α-D-laktoza	Kwas D- galakturonowy	L-fenyloalanina	α- Cyklodekstryna	
β-metylo-D-glukozyd	Kwas 2-hydroksy benzoesowy	L-seryna	Glikogen	
D-ksyloza	Kwas 4-hydroksy benzoesowy	L-treonina		
Erytritol	Kwas γ- hydroksymasłowy	Kwas glicylo-L-glutaminowy		
D-mannitol	Kwas itakonowy			
N-acetylo-D-glukozamina	Kwas α-oksomasłowy			
Fosforan 1-glukozy	Kwas D-jabłkowy			
Fosforan D, L-α-glicerolu				

Opracowanie własne na podstawie [52]

Dodatkowo firma stworzyła płytki zawierające sam barwnik redoks z możliwością samodzielnego przygotowania dowolnych kombinacji pożywek i specyficznych źródeł węgla.

Określanie metabolizmu populacji drobnoustrojów z zastosowaniem płytek ECO jest metodą względnie szybką oraz nieskomplikowaną. Zaletą niewątpliwie jest możliwość wyeliminowania klasycznych metod mikrobiologicznych, w tym izolacji czystych kultur mikroorganizmów i ich hodowli. Wadę stanowią natomiast wybrane źródła węgla, ponieważ substraty umieszczone na płytce nie zawsze reprezentują związki dostępne w środowisku. Należy także zwrócić uwagę, że ECOplate™ nie pozwoli na określenie specyficznych właściwości i funkcji danego konsorcjum drobnoustrojów, jak choćby zdolności do wiązania azotu atmosferycznego [31, 43].

Nie ulega wątpliwości, że zastosowanie płytek ECO do analizy społeczności mikroorganizmów glebowych dostarcza nowych informacji na temat ich różnorodności funkcjonalnej oraz może być wykorzystane do obserwacji zmian zachodzących w środowisku. Dowodzą tego liczne badania oparte na analizie metabolizmu drobnoustrojów. Dla przykładu warto podać badania Floch i wsp. (2011), które dotyczyły wpływu technik użytkowania gleby i stosowania środków ochrony roślin na funkcjonalność mikrobiomu glebowego [9]. Z zastosowaniem systemu Biolog określono także zmiany zachodzące w funkcjonowan iu mikrobiomu w wyniku akumulacji antybiotyków w glebie [29]. Funkcjonalna różnorodność mikroorganizmów jest równie ważna, co różnorodność strukturalna, bowiem poprzez pełnienie różnych funkcji mikrobiom uczestniczy w wielu procesach zachodzących w środowisku glebowym.

4. Analiza profili kwasów tłuszczowych

Metodą niewymagającą hodowli mikroorganizmów, a oceniającą ich aktywność i strukturę jest analiza kwasów tłuszczowych. Jest to metoda biochemiczno-fizyczna umożliwiająca identyfikację taksonomiczną mikroorganizmów poprzez oznaczenie kwasów tłuszczowych wchodzących w skład struktur komórkowych.

Fosfolipidy są niezbędnym składnikiem błon komórkowych każdej żywej komórki, nie występują zaś w produktach zapasowych i martwych komórkach. W warunkach naturalnych fosfolipidy stanowią zwykle stałą proporcję biomasy organizmów. W większości przypadków konkretne rodzaje kwasów tłuszczowych dominują u poszczególnych taksonów. Mikroorganizmy posiadają kwasy tłuszczowe o prostych łańcuchach, obecne także u innych organizmów np. jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFAs, Monounsaturated Fatty Acids) z grup omega9 i omega7. Mikroorganizmy cechują się również obecnością unikalnych kwasów tłuszczowych, między innymi kwasem 3-hydroksymasłowym oraz cyklopropanem [(8]. Większość kwasów tłuszczowych w komórkach bakteryjnych jest przyłączona do innych cząsteczek, głównie do fosfolipidów, glikolipidów i lipoprotein [57].

Kwasy znajdujące się w błonach są swoistymi biomarkerami ze względu na obecność w każdej żywej komórce oraz dużą różnorodność strukturalną i specyficzność biologiczną. Wykorzystanie tych związków do identyfikacji mikroorganizmów *in situ* jest szczególnie przydatne w taksonomii bakterii, a także w tworzeniu powiększającej się bazy danych pozwalającej na identyfikację biomarkerów.

Opierając się na założeniu, że taksony mikroorganizmów posiadają unikalne profile kwasów tłuszczowych (Tab. III) można je zidentyfikować oraz wykorzystać, jako indykatory struktury społeczności mikroorganizmów [5, 32]. Analiza lipidowa mikrobiomu glebowego polega na wyizolowaniu kwasów tłuszczowych z gleby, ekstrakcji w rozpuszczalnikach organicznych, a następnie analizie z zastosowaniem chromatografii gazowej. Powszechnie stosuje się dwie metody ekstrakcji lipidów z gleby: (1) analizę składu fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFA, Phospholipid Fatty Acid Analyses) oraz (2) analizę metylowanych estrów kwasów tłuszczowych (FAME, Fatty Acid Methyl Ester). Z zastosowaniem PLFA otrzymuje się frakcje lipidów pochodzące tylko z żywych komórek mikroorganizmów.

Tabela III
Przykładowe kwasy tłuszczowe wykorzystywane, jako biomarkery wybranych grup mikroorganizmów

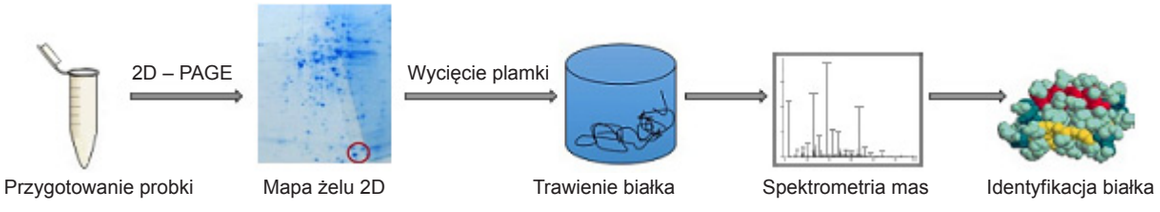
Grupa mikroorganizmów	Markerowe kwasy tłuszczowe	Piśmiennictwo
Bakterie Gram-dodatnie	15:0 *iso*, 15:0 *anteiso*, 16:0 *iso*, 17:0 *iso*, 17:0 *anteiso*	[38, 57]
Bakterie Gram-ujemne	kwasy cyklopropanowe: 17:0 *cy*, 19:0 *cy*, hydroksykwasy	[57]
Pseudomonas	16:0, 16:1 ω7*c*	[19]
Bacterioides	kwasy tłuszczowe z parzystą liczbą C	[37]
Arthrobacter	15:0 *anteiso*, 17:0	[19]
Grzyby	16:1 ω5*c*, 18:1 ω9*c*, 18:2	[36]

Wyizolowane w ten sposób specyficzne biomarkery lipidowe umożliwiają analizę struktury taksonomicznej mikrobiomu glebowego. Jednakże, metoda ta jest bardzo czasochłonna. Sześciodniowa procedura obejmuje: ekstrakcję kwasów tłuszczowych, izolację fosfolipidów poprzez ekstrakcję fazy stałej, przekształcenie fosfolipidów w FAME oraz analizę chromatograficzną [45]. Natomiast, analiza FAME jest mniej czasochłonna, a także wymaga mniejszej ilości materiału badawczego. Protokół zawiera czteroetapową ekstrakcję chemiczną i metylowanie wszystkich lipidów w próbce, a następnie ekstrakcję uzyskanych FAME oraz analizę chromatograficzną w ciągu jednego dnia. Należy mieć jednak na uwadze, że w trakcie analizy FAME otrzymuje się wszystkie lipidy glebowe – zarówno z żywych, jak i martwych komórek, a także z ulegającej rozkładowi biomasy zwierzęcej i roślinnej obecnej w glebie. Z tego powodu, metoda FAME nie może być używana do wiarygodnej taksonomicznej analizy mikrobiomu [7].

5. Analiza profili białkowych

Metody molekularne dostarczają biologom informacji odnośnie struktur genomu, jego funkcji oraz szlaków regulacyjnych i metabolicznych. Jednakże, do pełnego poznania metabolizmu mikroorganizmów oraz określenia jego reakcji na zmiany środowiskowe, konieczne jest scharakteryzowanie wszystkich składników komórki, czyli mRNA, białek, metabolitów i ich wzajemnych interakcji [42]. Potrzeba ta, doprowadziła do powstania nowych dziedzin nauki, takich jak: transkryptomika, metabolomika i proteomika [58]. Proteomem określa się zestaw wszystkich białek występujących w komórce, kodowanych przez genom, zatem proteomika dotyczy jego analizy, czyli badań białek, ich struktur oraz pełnionych funkcji [6]. Oznaczenie składu ilościowego i jakościowego białek komórkowych pozwala określić przynależność gatunkową mikroorganizmów. Proteomiczna identyfikacja mikroorganizmów polega na porównaniu i przypisaniu wyizolowanych z materiału białek do referencyjnego gatunku, który został już zidentyfikowany i zdeponowany w bazie [53]. Najpopularniejszą, a także największą bazą danych gromadzącą dane o strukturze przestrzennej białek i kwasów nukleinowych jest Protein Data Bank (PDB), w której na dzień 23.02.2018 zdeponowane było 137 917 struktur białkowych, w tym 49 146 bakteryjnych oraz 9 306 wirusowych. Proteomika opiera się na dwóch głównych biochemicznych strategiach izolacji i wizualizacji białek: z zastosowaniem żelu oraz bez żelu. Najpowszechniej stosowaną metodą jest żelowa elektroforeza dwuwymiarowa, tzw. 2D-PAGE. Została ona opracowana w 1975 roku przez O'Farrell'a [35], który jako pierwszy opisał procedurę separacji białek *Escherichia coli* w żelu poliakrylamidowym. Technika 2D-PAGE składa się z dwóch etapów. Pierwszym jest ogniskowanie izoelektryczne (IEF), podczas którego białka są rozdzielane na podstawie ich punktu izoelektrycznego w gradiencie pH w żelu. Drugim etapem elektroforezy jest rozdział białek w zależności od ich masy cząsteczkowej [24]. Z uzyskanego żelu wycina się „plamkę" zawierającą białko, poddaje się trawieniu i analizie spektrometrią mas, a uzyskane wyniki identyfikuje się z zastosowaniem baz danych (Rys. 4).

Najczęściej stosowaną elektroforezą dwuwymiarową jest elektroforeza z użyciem siarczanu dodecylu sodu, tzw. SDS-PAGE. Dzięki zastosowaniu tego związku dochodzi do rozfałdowania łańcucha polipeptydowego, a polipeptydy nabywają ładunek ujemny i mogą migrować w polu elektrycznym. SDS maskuje także dodatni ładunek niektórych polipeptydów, co sprawia, że wszystkie molekuły białkowe migrują w jednym kierunku. Dodatkowo używa się β-merkaptoetanolu, który ma silne właściwości redukujące i przecina mostki dwusiarczkowe (S-S) między białkami [20, 55]. Procedura takiej analizy obejmuje izolację białek komórkowych, rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym oraz barwienie rozdzielonych białek. Obecnie stosuje się różne barwniki, w tym barwniki fluorescencyjne, dzięki czemu czułość analizy białek z zastosowaniem żelu jest trochę większa, jednakże, metoda ta pozwala na identyfikację zaledwie kilkuset białek, co powoduje, że tylko proteomy o niskiej złożoności mogą być charakteryzowane w ten sposób [46, 58]. Metody niewykorzystujące żelu pozwalają na wykrycie kilku tysięcy białek oraz identyfikację białek nierozpuszczalnych [54]. Wśród technik niewymagających użycia żelu wyróżnia się przede wszystkim mikrokapilarną chromatogra-



Rys. 4. Schemat analizy proteomicznej z zastosowaniem elektroforezy dwuwymiarowej ze spektrometrią mas
Opracowanie własne na podstawie [56].

fię cieczową z spektrometrią mas (LC-MS/MS). Jednakże, obie te metody pozwalają na poznanie zaledwie 20–40% proteomu bakteryjnego. Umożliwia to identyfikację mikroorganizmów, ale nie dostarcza informacji ilościowych na temat ich białek. Wśród ilościowych metod proteomicznych, które pozwalają na dokładniejsze pomiary proteomów wyróżnia się: znaczenie izotopowe (ICAT) i znaczenie izobaryczne (iTRAQ) białek [58]. Wyzwanie w analizach proteomu stanowi fakt, że białka są bardzo trudnym obiektem badań. Związane to jest z ich złożoną, przestrzenną strukturą oraz występowaniem w kompleksach wielocząsteczkowych. Dodatkowo, proteom jest dynamiczny. Jego obraz zależy głównie od cyklu rozwojowego komórki oraz rozmieszczenia białek w strukturach komórkowych.

Proteomika rozwija się dynamicznie i posiada duży potencjał poznawczy. Umożliwia ona analizę zmian zachodzących w profilach białkowych mikroorganizmów pod wpływem różnych czynników środowiskowych np. stresu termicznego, braku źródła węgla, obecności antybiotyku, zmiany pH. Celem badań proteomicznych jest także odkrycie białkowych biomarkerów dla poszczególnych mikroorganizmów, co pozwoliłoby na szybką identyfikację drobnoustrojów bez konieczności analizowania całego proteomu.

6. Podsumowanie

Badania dotyczące analizy różnorodności mikrobiologicznej gleby są bardzo istotne dla zrozumienia wpływu zmian klimatu, działalności rolniczej człowieka oraz innych czynników antropogenicznych (pestycydy, metale ciężkie) na aktywność mikrobiomu glebowego, z którą związane są różnorodne procesy biogeochemiczne, a co za tym idzie jakość gleby. Opisane w niniejszym opracowaniu metody mogą się uzupełniać oraz być skorelowane z innymi (np. molekularnymi). Połączenie badań enzymatycznych z analizą ekspresji genów, z badaniami fizyko-chemicznymi gleby oraz analizą funkcjonalną mikrobiomu daje pełen obraz jakości i funkcji gleby. Wybór konkretnej metody badawczej jest uzależniony od wyników, jakie oczekuje się uzyskać, rodzaju próbki badanej, ale także czasu oraz środków, jakie można przeznaczyć na eksperyment.

Badania mikrobiomu glebowego są znaczące zarówno dla uzyskiwania lepszej jakości plonów z gleb użytkowanych rolniczo, jak i ze względu na utrzymanie bioróżnorodności środowiska. Mikroorganizmy glebowe mimo wielu lat badań nad ich identyfikacją i różnorodnością wciąż pozostają nie do końca poznaną grupą drobnoustrojów. Z tego powodu analizy mikrobiomu glebowego stawiają przed mikrobiologami szereg wyzwań, ale jednocześnie stanowią nieocenione źródło informacji.

Podziękowania

Publikacja została opracowana w ramach realizacji zadania 1.4 w Programie Wieloletnim IUNG-PIB na lata 2016–2020 oraz tematu statutowego 2.38.

Piśmiennictwo

1. Błońska E.: Enzymy glebowe i ich znaczenie w ocenie aktywności biologicznej gleb leśnych na przykładzie rezerwatów przyrody nizin i wyżyn Polski. *Roczniki Gleboznawcze*, Warszawa, **LXII**, 4, 163–172 (2011)
2. Casida L.E. Jr., Klein D.A., Santoro T.: Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci*. **98**, 371–376 (1964)
3. Deng S., Kang H., Freeman C.: Microplate Fluorimetric Assay of Soil Enzymes (w) Methods of Soil Enzymology, red. R.P. Dick, Soil Science Society of America, Madison, 2011, s. 311–315
4. Dick W.A.: Development of a Soil Enzyme Reaction Assay (w) Methods of Soil Enzymology, red. R.P. Dick, Soil Science Society of America, Madison, 2011, s. 71–84
5. Ding C.H., He J.: Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 925–941 (2010)
6. Dmitrzak-Węglarz M., Hauser J.: Wykorzystanie badań proteomicznych w poszukiwaniu markerów biologicznych dla chorób psychicznych. *Via Medica*, **3**, 118–127 (2006)
7. Dunfield K.E.: Lipid-Based Community Analysis (w) Soil Sampling and Methods of Analysis, red. M.R. Carter, E.G. Gregorich, 2nd Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008, s. 557–567
8. Eivazi F., Tabatabai M.A.: Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem*. 9, 167–172 (1977)
9. Floch C., Chevremont A.C., Joanico K., Capowiez Y., Criquet S.: Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® Ecoplates. *Eur. J. Soil Biol.* **47**, 256–263 (2011)
10. Frankenberger W.T., Tabatabai M.A.: Amidase activity in soils. I. Method of assay. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **44**, 282–287 (1980)
11. Freney J.R., Williams C.H.: The sulphur cycle in soil (w) The global biogeochemical sulfur cycle, red. M.V. Ivanov, J.R. Freney, CSOPE 19, John Wiley & Sons, New York, 1983, s. 129–201
12. Friedel J.K., Mälter K., Fischer W.R.: Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazolium chloride and iodonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils*. **18**, 292–296 (1994)
13. Furtak K., Gajda A.M.: Activity of dehydrogenases as an indicator of soil environment quality. *Pol. J. Soil Sci.* **50**, 1, 33– 40 (2017)
14. Furtak K.: Analiza profilu metabolicznego populacji mikroorganizmów z zastosowaniem techniki ECOplate Biolog (w) Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki Przyrodnicze, red. M. Panfil, Wydawnictwo Młodzi Naukowcy, Poznań, 2017, Część I, s. 31–37
15. Gajda A.M.: Mikrobiologiczne i biochemiczne wskaźniki jakości gleb pod pszenicą w zależności od systemu uprawy roli. Monografie i Rozprawy Naukowe, IUNG-PIB, 46, Puławy, 2015
16. Gajda A.M., Czyż E.A., Stanek-Tarkowska J., Dexter A.R., Furtak K.M., Grządziel J.: Effects of long-term tillage practices on the quality of soil under winter wheat. *Plant Soil Environ.* **63**, 5, 236–242 (2017)
17. Gałązka A., Łyszcz M., Abrymczyk B., Furtak K., Grządziel J., Czaban J., Pikulicka A.: Bioróżnorodność środowiska glebowego – przegląd parametrów i metod w analizach różnorodności biologicznej gleby. Monografie i Rozprawy Naukowe, IUNG-PIB, 49, Puławy, 2016

18. Garland J.L., Mills A.: Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis or patterns of community level sole carbon source utilization: *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351 (1991)
19. Haack S.K., Garchow H., Odelson D.A., Forney L.J., Klug M.J.: Accuracy, reproducibility, and interpretation of Fatty Acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environ. Microbial*. **60**, 7, 2483–2493 (1994)
20. Hames D.B., Hooper N.M.: Biochemia-krótkie wykłady. Wyd. Naukowe PWN, 2009, s. 68–71
21. Hatzinger P.B., Palmer P., Smith R.L., Pe Arrieta C.T., Yoshinari T.: Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **52**, 47–58 (2003)
22. Hoffman G., Teicher K.: Ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Böden. *Zeit. Pflanzenernaehr. Dung. Bodenkunde*, **95**, 55–63 (1961)
23. Killham K., Rashid M.A.: Assay of activity of a soil deaminase. *Plant Soil*, **92**, 15–21 (1986)
24. Kim M.R., Kim C.W.: Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *J. Chromatogr.* **849**, 203–210 (2007)
25. Kozdrój J.: Metagenom – źródło nowej informacji o mikroorganizmach glebowych. *Post. Mikrobiol.* **52**, 2, 185–200 (2013)
26. Ladd J.N., Butler J.H.A.: Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrate. *Soil Biol. Biochem*. **4**, 19–30 (1972)
27. Ladd J.N., Jackson R.B.: Biochemistry of ammonification (w) Nitrogen in agricultural soils red. F.J. Stevenson, *Am. Soc. Agron. Madison*, 1982, s. 173–228
28. Lechevalier M.P.: Lipids in bacterial taxonomy (w) Practical handbook of microbiology, red. O'Leary W.M., CRC, Boca Raton, 1989, s. 455–561
29. Liu F., Wu J., Ying G.G., Luo Z., Feng H.: Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1615–1623 (2012)
30. Lv T., Zhang Y., Carvalho P.N., Zhang L., Button M., Arias C.A., Weber K.P., Brix H.: Microbial community metabolic function in constructed wetland mesocosms treating the pesticides imazalil and tebuconazole. *Ecol. Eng.* **98**, 378–387 (2017)
31. Malosso E., English L., Hopkins D.W., O'Donnell A.G.: Community level physiological profile response to plant residue additions in Antarctic soils. *Biol. Fertil. Soils*. **42**, 60–65 (2005)
32. Marchut-Mikołajczyk O., Kwapisz E., Antczak T.: Enzymatyczna bioremediacja ksenobiotyków. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, **16**, 39– 55 (2013)
33. Mocek-Płóciniak A.: Wykorzystanie aktywności enzymatycznej do oceny wpływu antropogenicznych zmian wywołanych przez metale ciężkie w środowisku glebowym. *Nauka Przyr. Technol.* **4**, 86 (2010)
34. Nannipieri P., Ascher J. Ceccherini M.T.; Landi L., Pietramellara G., Renella G.: Microbial diversity and soil function. *Eur. J. Soil Sci.* **54**, 655–670 (2003)
35. O'Farrell P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021 (1975)
36. Olsson P.A., Larsson L., Bago B., Wallander H., van Aarle I.M.: Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **159**, 1, 7–10 (2003)
37. Olsson S., Persson P.: The composition of bacterial populations in soil fractions differing in their degree an adherence to barley roots. *Appl. Soil. Ecol.* **12**, 205–215 (1999)
38. Pennanen T., Perkiomaki J., Kiikkila O., Vanhala P., Neuvonen S., Fritze H: Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**, 291–300 (1998)
39. Pritsch K., Raidl S., Marksteiner E., Blaschke H., Agerer R., Schloter M., Hartmann A.: A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *J. Microbiol. Methods.* **58**, 233–241 (2004)
40. Prosser J.A., Speir T.W., Stott D.E.: Soil Oxidoreductases and FDA Hydrolysis (w) Methods of Soil Enzymology, red. R.P. Dick, SSSA Book Series, no. 9, Soil Science Society of Amercica, Madison, USA, 2011, s. 103–124
4.1 Protein Data Bank (PDB): Protein-only Structures Released Per Year, https://www.rcsb.org/pdb (18.01.2018)
42. Rocha E.P.: The organization of the bacterial genome. *Annu Rev. Genet.* **42**, 211–223 (2008)
43. Ross M., Goberna M., Pascual J.A., Klammer S., Insam H.: 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *J. Microb. Meth.* **72**, 221–226 (2008)
44. Scherer-Lorenzen M., Palmborg C., Prinz A., Schulze E.D.: The role of plant diversity and composition for nitrate leaching in grasslands. *Ecology*, **84**, 6, 1539–1552 (2003)
45. Smithwick E.A.H., Turner M.G., Metzger K.L., Balser T.C.: Variation in NH_4^+ mineralization and microbial communities with stand age in lodgepole pine (*Pinus contorta*) forests, Yellowstone National Park (USA). *Soil Biol. Biochem*. **37**, 1546–1559 (2005)
46. Sonck K.A., Kint G., Schoofs G., Vander Wauven C., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.: The proteome of Salmonella typhimurium grown under in vivo-mimicking conditions. *Proteomics*, **9**, 565–579 (2009)
47. Tabatabai M.A., Bremner J.M.: Factors affecting soil arylsulfatase activity. *Soil Sei. Soc. Amer. Proc.* **34**, 427–429 (1970)
48. Tabatabai M.A., Bremner J.M.: Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem*. **1**, 301–307 (1969)
49. Tabatabai M.A., Dick W.A.: Enzymes in soil: Research and developments in measuring activities (w) Enzymes in the Environment, red. R.G. Bums, R.P. Dick, Marcel Dekker, New York, 2002, 21, s. 567–996
50. Wagg C., Bender S.F., Widmerc F., van der Heijdena M.G.A.: Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14, 5266–5270 (2014)
51. Weber K.P., Legge R.L.: Community-level physiological profiling. *Methods Mol Biol.* **599**, 263–281 (2010)
52. Weber K.P., Legge R.L.: One-dimensional metric for tracking bacterial community divergence using sole carbon source utilization patterns, *J. Microbiol. Meth.* **79**, 55–61 (2009)
53. Welker M.: Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics*, **11**, 3143–3153 (2011)
54. Wolff S., Otto A., Albrecht D., Zeng J.S., Buttner K., Gluckmann M., Hecker M., Becher D.: Gel-free and gel-based proteomics in Bacillus subtilis: a comparative study. *Mol. Cell Proteomics*, **5**, 1183–1192 (2006)
55. Wu W., Zhang H.H.: Analysis of gene expression at the proteomic level (w) Gene Biotechnology, red. W. Wu, M.J. Welsh, P.B. Kaufman, H.H. Zhang, CRC Press LLC, 2004, s. 265–287
56. Zarag S.M., Gupta N., Mir R.A., Rai V.: Shift from Gel Based to Gel Free Proteomics to Unlock Unknown Regulatory Network in Plants: A Comprehensive Review. *J. Adv. Res. Biotech*. **1**, 2, 19 (2016)
57. Zelles L.: Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fert. Soils*. **29**, 111–129 (1999)
58. Zhang W., Li F., Nie L.: Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology*, **156**, 287–301 (2010)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 2, 203–206
http://www.pm.microbiology.pl

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

KONFERENCJA MIĘDZYNARODOWA 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.

Tegoroczne 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.
Pani prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa, zuzanna.drulis-kawa@uwr.edu,pl, tel. 71 375 62 90
Pani prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska, dabrok@iitd.pan.wroc.pl, tel. 71 337 11 72 w. 316

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

KONFERENCJA MIĘDZYNARODOWA POD PATRONATEM PTM

4th Congress of Baltic Microbiologists
Gdańsk, 10–12 września 2018 r.

zapraszamy do wzięcia udziału w konferencji „4th Congress of Baltic Microbiologists",
która odbędzie się w Gdańsku w dniach 10–12 września 2018 r.

Członkowie PTM mają możliwość skorzystania ze zniżki na opłatę konferencyjną, wszelkie informacje
na stronie internetowej konferencji (informacja widoczna pod wysokościami opłat w poszczególnych kategoriach):
http://cbm2018.ug.edu.pl/general-info/fees/

Strona ze wstępnym programem konferencji – sesjami tematycznymi zawiera informację o zaproszonych wykładowcach plenarnych:
http://cbm2018.ug.edu.pl/program/

Strona z informacją o organizatorach, wykładowcach plenarnych oraz komitecie naukowym
– wszyscy członkowie komitetu naukowego będą jednocześnie zaproszonymi wykładowcami w poszczególnych sesjach tematycznych:
http://cbm2018.ug.edu.pl/general-info/committies/

Organizator:

Pan prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn, Uniwersytet Gdański Wydział Biologii,
ul Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk.
Informacje na stronie internetowej: http://cbm2018.ug.edu.pl/

Organizatorzy wszystkich konferencji współorganizowanych przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów i obejmowanych patronatem PTM powinni zagwarantować zniżkowe opłaty rejestracyjne dla członków PTM (Uchwała nr 31–2017 z dnia 31.08.2017 r.)

W dniu 19.03.2018 r. odbyło się drugie zebranie
Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów kadencji 2016–2020

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

1. Prezes PTM – prof. Stefan Tyski powitał zebranych – przybyli wszyscy członkowie ZG PTM (z wyjątkiem przedstawicieli Oddziału Bydgoszcz oraz Oddziału Puławy), a także 7 zaproszonych gości (dr Elżbieta Stefaniuk – przewodnicząca Głównej Komisji Rewizyjnej, prof. dr hab. Jacek Bielecki – redaktor naczelny Postępów Mikrobiologii, dr Radosław Stachowiak – z-ca redaktora naczelnego PM, Mariola Machowska-Kacprzak – księgowa PTM, dr Tomasz Zaręba, przewodniczący Sekcji Mikrobiologia Farmaceutyczna, Zbigniew Kowal, Prezes firmy Global Congress oraz Barbara Tutak z firmy Global Congress organizującej FEMS Council 2018 w Warszawie).
   Po przyjęciu programu zebrania nastąpiła prezentacja wszystkich uczestników spotkania.
2. Wybrano 2 osobową Komisję Skrutacyjną.
3. Jednomyślnie przyjęto sprawozdanie z Zebrania ZG PTM w dniu 27.03.2017 r. (Uchwała nr 12–2018).
4. Prezes PTM przedstawił informację o działalności Prezydium PTM od poprzedniego zebrania ZG PTM w dniu 27.03.2017 r.
   4.a. Poinformował o 4 internetowych zebraniach Prezydium ZG PTM w terminach: 30 sierpnia, 12 września, 31 października 2017 r. oraz 15.01.2018 r., podczas których odbyły się elektroniczne głosowania szeregu Uchwał przez członków Prezydium ZG PTM. Prezes podkreślił, że informacje o działalności PTM zamieszczane były we wszystkich zeszytach kwartalników: Postępy Mikrobiologii (PM), Polish Journal of Microbiology (PJM) oraz Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia (MDiM), a także w 3 listach do członków ZG PTM, wysłanych w dniach 23.05.2017 r., 13.09.2017 r. oraz 02.01.2018 r.
   4.b. Do dnia zebrania odnotowano prawie 500 „polubień" na facebooku PTM.
   4.c. Omawiając stronę internetową towarzystwa, Prezes PTM podkreślił, że została ona utworzona m.in. w oparciu o życzenia członków PTM. Zostały utworzone zakładki umożliwiające rozpoczęcie działalności szeregu sekcji PTM (bakteriologia kliniczna, wirusologia kliniczna, mykologia kliniczna, mikrobiologia farmaceutyczna, żywności, przemysłowa, środowiskowa, diagnostyka laboratoryjna), jednakże brak jest, poza sekcją mikrobiologii farmaceutycznej, zainteresowania nimi. Zwłaszcza dziwi brak aktywności diagnostów laboratoryjnych – członków PTM. Po dyskusji postanowiono jednak nie likwidować sekcji, lecz nadal umożliwić chętnym podjęcie działalności w ramach sekcji.
   Niewielki jest udział Oddziałów w rozwoju strony PTM. Co prawda zamieszczono plakaty przygotowane przez poszczególne Oddziały, z okazji konferencji „90 lat PTM", jednakże wskazane jest, aby każdy Oddział Terenowy PTM zamieszczał aktualne informacje o swojej działalności, planach, wykładach, konferencjach itp. Część Oddziałów Terenowych PTM regularnie przysyła już do biura PTM informacje wstawiane na stronę internetową. Nadal bardzo prosimy o nadsyłanie uwag, co do zawartości i wyglądu nowej strony PTM, a także podawanie informacji dodatkowych, które uważacie Państwo, że powinny dotrzeć do szerokiego gremium członków naszego Towarzystwa. (ptm.zmf@wum.edu.pl). Strona jest poprawiana i aktualizowana na bieżąco, tak, aby stać się możliwie dobrą, atrakcyjną wizytówką PTM.
   4.d. Od 1 stycznia 2018 roku utworzyliśmy możliwość logowania się na stronie PTM (do 15.03.2018 r. załogowały się 263 osoby). Strona umożliwia samodzielne uaktualnienie danych osobowych, uzyskanie informacji o płatnościach składek, a także dostęp do najnowszych numerów Postępów Mikrobiologii. Oczekujemy na propozycję, jakie jeszcze treści możemy przekazywać członkom PTM po ich załogowaniu się.

4.e. Zapoznano zebranych z informacją na temat działalności Federacji Polskich Towarzystw Medycznych, do których należy PTM, a Pani prof. dr hab. Zofia Zwolska pełni funkcję sekretarza FPTM.
Uznano, że przynależność PTM do FPTM jest korzystne dla PTM, a związane z tym płacenie rocznej składki (250 zł) jest zasadne.

4.f. Poinformowano o zakupieniu przez PTM certyfikatu SSL (Secure Socket Layer), do strony internetowej. Jest to narzędzie poświadczające wiarygodność domeny oraz jej właściciela. Potwierdza bezpieczeństwo szyfrowania danych przesyłanych pomiędzy użytkownikiem a serwerem. Jest gwarantem zachowania poufności danych i całej komunikacji. Poinformowano również o sprawach związanych z ochroną danych osobowych oraz przepisami RODO, które niedługo zaczną obowiązywać.

4.g. Poinformowano o przekazaniu w ubiegłym roku przez Fundację Polskiej Mikrobiologii na rzecz PTM kwoty 27.527 zł, w związku z likwidacją fundacji.

4.h. Poinformowano o przekazaniu w ubiegłym roku tekstu „Stanowisko Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w sprawie przyznania absolwentom uniwersyteckich studiów magisterskich na kierunku Mikrobiologia prawa wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego" do Pana Prezydenta RP Andrzeja Dudy, Pani Premier Beaty Szydło, Pana Ministra ds. Zdrowia Konstantego Radziwiłła i Pana Ministra ds. Nauki Jarosława Gowina. Od Pana Ministra K. Radziwiłła otrzymaliśmy odpowiedź, że prace nad ustawą są prowadzone i nasze stanowisko będzie wzięte pod uwagę.

4.i. Przekazano informację o Nadzwyczajnym Walnym Zgromadzeniu Delegatów PTM, które odbyło się podczas konferencji „90 lat PTM". Bardzo ważną sprawą było uzyskanie opinii prawnej odnośnie możliwości powołania Pełnomocników Delegatów na NWZD PTM, co umożliwiło uzyskanie quorum na Walnym Zgromadzeniu Delegatów, wymaganego do wprowadzania zmian w Statucie PTM. Po uzyskaniu wszystkich materiałów z NWZD, z pomocą Kancelarii Prawnej został przygotowany wniosek o wpis nowego Statutu PTM do Krajowego Rejestru Sądowego (KRS), który zatwierdzi proponowane zmiany Statutu. Ze względu na drobną pomyłkę w numeracji punktów Statutu wniosek oddalono. Poprawiono Statut i ponownie złożono go do KRS – było to możliwe dzięki uchwale przyjętej podczas NWZD powołującej „Komisję Statutową do dokonania drobnych zmian w Statucie PTM na wniosek sądu".

4.j. Poinformowano o 2 wnioskach do MNiSW o przyznanie środków finansowych z puli przeznaczonej na działalność upowszechniającą naukę (DUN) – na konferencję „90 lat PTM" (otrzymaliśmy 70.000 zł, aktualnie sprawozdanie i rozliczenie finansowe konferencji oceniane jest w MNiSW) oraz na rozwój i modernizację czasopism PM i PJM w latach 2018–2019 (otrzymaliśmy informację o przyznaniu kwoty 65.200 zł)

4.k. Omówiono sprawę porządkowania listy członków PTM. Przed konferencją „90 lat PTM" usunięto z Towarzystwa ponad 200 osób nie opłacających składek członkowskich w terminie. W PTM pozostały osoby z opłaconymi składkami za lata 2015 i/lub 2016 i/lub 2017.

4.l. Prezes PTM omówił pokrótce wszystkie przyjęte przez Prezydium PTM Uchwały od czasu ostatniego posiedzenia ZG PTM (Uchwały nr 20–43 z 2017 r. i nr 1–11 z 2018 r.). Uchwały Prezydium zaakceptowano jednomyślnie (Uchwała nr 13–2018).

5. Pan prof. dr hab. Jacek Międzybrodzki, wiceprezes PTM, podsumował konferencję jubileuszową „90 lat PTM wczoraj – dziś – jutro", która odbyła się w Krakowie w dniach 22–23.09.2017 r. i oceniona była bardzo pozytywnie przez uczestników. Materiały konferencyjne znajdują się na stronie PTM, ponadto przygotowano streszczenia wykładów i plakatów w języku angielskim i opublikowano ten materiał w Suplemencie 3/2017 kwartalnika Postępy Mikrobiologii.
6. Pani dr Agnieszka Laudy, sekretarz PTM, przedstawiła listę 22 kandydatów na nowych członków zwyczajnych PTM, jednomyślnie przyjęto Uchwałę nr 14–2018 w tej sprawie. Niestety nie wpłynęła ani jedna nowa deklaracja o chęci przystąpienia do PTM członka wspierającego. Omówiła również sprawę usunięcia z grona członków PTM osób z nieopłaconą składką począwszy od roku 2015, czyli za lata 2015–2017 (zgodnie ze starym obowiązującym Statutem) – Uchwała nr 15–2018.
7. Podjęto decyzję o podniesieniu wynagrodzenia księgowej PTM z powodu dodatkowej pracy związanej z wypełnianiem formularzy dotyczących wprowadzenia jednolitego pliku kontrolnego (JPK) w księgowości (Uchwała nr 16–2018).
8. Podjęto Uchwałę nr 17–2018 w sprawie zatrudnienia Pana mgr Adama Guśpiela z NIZP-PZH na stanowisku sekretarza PJM.
9. Przychylono się do prośby Pana prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna z Uniwersytetu Gdańskiego o objecie patronatem przez PTM konferencji „4th Congress of Baltic Microbiologists" organizowanej przez Uniwersytet Gdański 10–12 września 2018 r. Postanowiono również poprzeć wniosek Pana profesora o dofinansowanie konferencji przez FEMS (w przypadku przyznania środków przez FEMS, PTM również dofinansuje konferencję w kwocie 250 Euro), Uchwała nr 18–2018.
10. Omówiono sprawę organizacji kolejnej edycji Konkursu o Nagrodę Naukową im. Prof. Edmunda Mikulaszka przyznawanej autorom publikacji przez PTM. Obecna edycja dotyczy prac opublikowanych w latach 2016–2017. Zwrócono uwagę na konieczność opracowania nowego regulaminu Konkursu. Regulamin zostanie opracowany przez Komisję Konkursową i zatwierdzony przez Prezydium ZG PTM (Uchwała nr 19–2018). Jednomyślnie podjęto Uchwałę nr 20–2018 o powołaniu Komisji Konkursowej w składzie: prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba, przewodnicząca oraz członkowie: prof. dr hab. Jacek Bielecki, Redaktor Naczelny kwartalnika Postępy Mikrobiologii, prof. dr hab. Elżbieta A. Trafny, Redaktor Naczelny kwartalnika Polish Journal of Microbiology, prof. dr hab. Małgorzata Bulanda, prof. dr hab. Wiesław Kaca, dr hab. Beata Anna Sadowiska, prof. nadzw. Uniwersytetu Łódzkiego, dr hab. Beata Krawczyk, prof. nadzw. Politechniki Gdańskiej.
11. Pani prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopeć, wiceprezes PTM, omówiła przygotowany przez Prezydium ZG PTM „Regulamin Działalności ZG PTM". Uchwałą nr 21–2018 Regulamin przyjęto jednomyślnie do stosowania, po zatwierdzeniu przez KRS nowego Statutu PTM.
12. Na prośbę Komisji Egzaminacyjnej przeprowadzającej Państwowy Egzamin Specjalizacyjny Diagnostów Laboratoryjnych w dziedzinie mikrobiologii medycznej dokonano wyboru nowych kandydatów reprezentujących PTM. W Uchwale nr 22–2018 przyjęto, że w Komisji Egzaminacyjnej przeprowadzającej Państwowy Egzamin Specjalizacyjny Diagnostów Laboratoryjnych w dziedzinie mikrobiologii medycznej PTM będą reprezentować: dr hab. Edyta Podsiadły, dr hab. Katarzyna Leszczyńska, dr Joanna Jursa-Kulesza oraz dr Bonita Durnaś.
13. Przewodniczący Zarządów Oddziałów Terenowych PTM przedstawili informacje z działalności swoich Oddziałów w ub. r. i okresie do 19.03.2018 r. w tym o odbytych konferencjach pod patronatem PTM. Przedstawili również plany działalności Oddziałów w najbliższych latach.

Na dzień 19.03.2018 r., składki PTM za rok 2017 i lata wcześniejsze opłaciło 413 osób, ponadto za rok **2018 składki opłaciło 501** członków PTM, odpowiednio z Oddziałów: Warszawa – 97 i **89** osób, Kraków – 60 i **64** osób, Bydgoszcz – 39 i **37** osób, Katowice – 34 i **60** osób, Szczecin – 31 i **35** osób, Poznań – 29 i **45** osób, Gdańsk – 26 i **31** osób, Lublin – 26 i **32** osób, Łódź – 19 i **26** osób, Białystok – 12 i **18** osób, Wrocław – 12 i **18** osób, Kielce – 12 i **11** osób, Puławy – 11 i **9** osób, Olsztyn – 5 i **26** osób.
Składka za 2018 r., zgodnie z prośbą ZG PTM powinna być uregulowana w I kwartale tego roku:
https://www.microbiology.pl/czlonkowie-i-skladki/czlonkowie-zwyczajni/.

14. Prezes PTM, jednocześnie delegat PTM do FEMS i IUMS, przedstawił działalność FEMS i IUMS, zwracając uwagę na uzyskane wsparcie PTM ze strony FEMS. Trzy konferencje otrzymały dofinansowanie FEMS: 90 lat PTM (3.000 Euro), konferencja międzynarodowa „Non-conventional yeast: from basic research to application", Rzeszów 15–18.05.2018 r. (5.000 Euro) oraz konferencja międzynarodowa **„**Viruses of Microbes V: Biodiversity and future applications", Wrocław, 9–13 lipca 2018 r. (5.000 Euro).
Dwaj członkowie PTM otrzymali FEMS Research Grant na wyjazdy do naukowych ośrodków zagranicznych. Niestety brak było zgłoszeń chętnych na FEMS Research Grant w I konkursie 2018 r.
Złożone zostały 2 wnioski o granty FEMS dofinansowujące wyjazdy na konferencje naukowe, jeden został zaakceptowany przez FEMS. PTM uregulowało składki członkowskie w FEMS (5.619,85 zł) oraz IUMS (4.022,62 zł).
15. Przekazano informację o spotkaniu FEMS Council, które ma się odbyć w Warszawie w dniach 7–8.09.2018 r. Pan Zbigniew Kowal, Prezes firmy Global Congress oraz Pani Barbara Tutak poinformowali o współpracy z FEMS i ustaleniach dotyczących organizowania planowanego spotkania. Ustalono, że w przypadku dobrej organizacji FEMS Council, firma Global Congress będzie uczestniczyć w organizacji XXIX Zjazdu PTM w Warszawie we wrześniu 2020 r.
16. Pani Mariola Machowska-Kacprzak, księgowa PTM poinformowała o stanie finansowym PTM. Koszty wydawania czasopism w 2017 r. nadal były bardzo wysokie, ogólny koszt wydawania PM wyniósł – 67.093,50 zł, zaś PJM – 89.849,78 zł. Zapowiadane w 2017 r. zmiany funkcjonowania czasopism PTM w tym rezygnacja z nieodpłatnej wysyłki zeszytów PM lub PJM powinny przynieść poprawę sytuacji finansowej czasopism dopiero w bieżącym roku. Dużym wsparciem finansowym była dotacja MNiSW na Konferencję 90 lat PTM, która pozwoliła zakończyć konferencję z niewielkim zyskiem, jak również kwota przekazana przez Fundację Polskiej Mikrobiologii. Przedstawiono bilans finansowy PTM za 2017 r.
17. Pani dr Elżbieta Stefaniuk, Przewodnicząca Głównej Komisji Rewizyjnej PTM, pozytywnie skomentowała opracowany bilans finansowy PTM za 2017 r. Został on przyjęty przez członków ZG PTM i pozytywnie zaopiniowany przez Główną Komisję Rewizyjną PTM.
18. Pani Mariola Machowska-Kacprzak, księgowa PTM i Prezes PTM omówili sprawę korzystania z funduszy PTM w Oddziałach Terenowych. Problem możliwości dostępu do środków finansowych PTM i wydatkowania ich na potrzeby Oddziałów od kilku lat był podnoszony przez szereg członków ZG PTM, a także delegatów na NWZD w Krakowie. Podjęło Uchwałę nr 23–2018 w sprawie powołania komisji do opracowania regulaminu, wydatkowania i rozliczania funduszy przyznawanych Oddziałom Terenowym PTM w wysokości 10% ze składek członkowskich, jakie wpłynęły od członków PTM danych oddziałów w roku poprzedzającym wydatki. W skład komisji wejdą przedstawicie Oddziałów Terenowych ze Szczecina, Katowic i Warszawy. Komisja ta powinna opracować zasady umożliwiające Oddziałom korzystanie w 2019 r. z funduszy PTM.
Jednocześnie przypominamy, że zgodnie z Uchwałą nr 33–2017 z dnia 30.08.2017 r. Prezydium ZG PTM podjęto decyzję w sprawie udostępnienia Oddziałom Terenowym PTM od stycznia 2018 r. 50% kwoty uzyskanej z tytułu pozyskania sponsora, Członka Wspierającego PTM, darowizny, lub innej dodatkowej kwoty, na rzecz PTM, przez dany Oddział, na pokrycie kosztów prowadzenia działalności statutowej przez ten Oddział. Jak na razie Oddziały nie pozyskały żadnych dodatkowych funduszy.
19. Przekazano informacje o wydawanych czasopismach PTM i sytuacji w redakcjach:
    19.a. Pan prof. dr hab. Jacek Bielecki, Redaktor Naczelny PM, poinformował o utworzeniu nowej strony PM oraz 54 manuskryptach przesyłanych do redakcji w 2017 r. i opublikowanych 42 pracach w 4 zeszytach.
    19.b. Pani prof. dr hab. Elżbieta A. Trafny, Redaktor Naczelny PJM, poinformowała o trudnościach z prowadzeniem czasopisma PJM, rezygnacji 2 redaktorów naczelnych, prof. Izabeli Sitkiewicz i prof. Jolanty Soleckiej oraz zmianach w obsadzie redakcji. Poinformowała o rozpoczęciu wydawania internetowej wersji PJM przez firmę Exeley inc. w nowym systemie Editorial Manager. Przypomniano, że opłaty redakcyjne dla manuskryptów prac przesyłanych do PJM od 01.07.2018 r. wzrosną dwukrotnie – 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).
    19.c. Przypomniano o Uchwale nr 11–2018 w sprawie niefinansowania kwartalnika Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia oraz rezygnacji z zapisu dotyczącego PTM w treści informacji „organ Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów". Jednakże 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" ma zostać zamieszczona na wewnętrznej stronie okładki wszystkich zeszytów kwartalnika począwszy od numeru 1/2018 r.
20. Podjęło decyzję o nie obejmowaniu patronatem PTM sesji mikrobiologicznej „Czy możliwe jest życie bez konserwantów" na międzynarodowej konferencji naukowo-szkoleniowej „Wielowymiarowość zdrowia", w terminie 12–13 października 2018 w Skierniewicach (Uchwala nr 24–2018) z powodu niedostatecznego prezentowania zagadnień mikrobiologicznych.
21. Jednomyślnie podjęto decyzję w sprawie objęcia patronatem konferencji „II Sesji Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego" w terminie 8 czerwca 2018 roku w Łodzi (Uchwala nr 25–2018).

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

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

SPIS TREŚCI

M. Binek, M. Kizerwetter-Świda, D. Chrobak-Chmiel – Wkład mikrobiologii weterynaryjnej w budowę idei wspólnego zdrowia 95
M. Lewańska, A. Godela, M. Myga-Nowak – Listerioza. Współczesne postrzeganie zagrożenia epidemiologicznego 106
J. Dąbrowska, A. Kunicka-Styczyńska – *Alicyclobacillus* – bakterie nadal poznawane 117
J. Michalska, I. Greń, A. Mrozik – Cele, strategie i ocena efektywności bioaugmentacji osadu czynnego zdefiniowanymi mikroorganizmami w usuwaniu toksycznych związków chemicznych 125
M. Wiciński, K. Leis, B. Malinowski, M.M. Węclewicz, E. Grześk, G. Grześk – Ortomyksowirusy – wirusy grypy i inne 138
A. Żuk-Wasek, M. Przybylski, N. Żeber, G. Młynarczyk, T. Dzieciątkowski – Zakażenia gammaherpeswirusami u osób z upośledzeniem odporności 145
I. Kozyra, A. Rzeżutka – Zwierzęta gospodarskie i towarzyszące jako rezerwuar zoonotycznych szczepów rotawirusa 156
R.B. Klekotka, E. Mizgała-Izworska, W. Drzastwa, B. Mazur – Rola *Staphylococcus aureus* w diagnostyce klinicznej pacjentów z cukrzycą 166

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

D. Artyszuk, T. Wołkowicz – Zastosowanie sekwencjonowania pełnogenomowego do genotypowania bakterii 179
K. Furtak, A.M. Gajda – Biochemiczne metody oceny różnorodności funkcjonalnej i strukturalnej mikroorganizmów glebowych 194

KOMUNIKATY, INFORMACJE 203

CONTENTS

M. Binek, M. Kizerwetter-Świda, D. Chrobak-Chmiel – Contribution of veterinary microbiology to the 'One Health' idea 95
M. Lewańska, A. Godela, M. Myga-Nowak – Listeriosis. Modern perception of epidemiological threat 106
J. Dąbrowska, A. Kunicka-Styczyńska – *Alicyclobacillus* – bacteria still not understood 117
J. Michalska, I. Greń, A. Mrozik – Objectives, strategies and evaluation of the effectiveness of activated sludge bioaugmentation with defined microorganisms in the removal of toxic chemicals ... 125
M. Wiciński, K. Leis, B. Malinowski, M.M. Węclewicz, E. Grześk, G. Grześk – Orthomyxoviruses – Influenza and other viruses 138
A. Żuk-Wasek, M. Przybylski, N. Żeber, G. Młynarczyk, T. Dzieciątkowski – Gammaherpesviral infections in patients with immunological disorders 145
I. Kozyra, A. Rzeżutka – Farmed and companion animals as reservoirs of zoonotic rotavirus strains 156
R.B. Klekotka, E. Mizgała-Izworska, W. Drzastwa, B. Mazur – The role of *Staphylococcus aureus* in the clinical diagnosis of diabetic patients 166

METHODS AND STANDARDS

D. Artyszuk, T. Wołkowicz – Implementation of whole genome sequencing for bacteria genotyping 179
K. Furtak, A.M. Gajda – Biochemical methods for the evaluation of the functional and structural diversity of microorganisms in the soil environment 194

NEW REPORTS, INFORMATION 203