Kwartalnik
Tom 57
Zeszyt 4•2018
PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:
PMKMAV 57 (4)
2018

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 101,48 (2017)
Impact Factor ISI = 0,354 (2017)
Punktacja MNiSW = 15,00 (2016)
Scopus Cite Score = 0,29 (2017)

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)
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

RADOSŁAW STACHOWIAK (Zastępca)
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

AGNIESZKA SOBOLEWSKA-RUTA (Sekretarz)
Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa; tel. 22 3786229
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

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:

MONIKA ADAMCZYK-POPŁAWSKA (Wirusologia)
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Biotechnologia i mikrobiologia środowiskowa)
AGNIESZKA KWIATEK (Wirusologia)
BOHDAN STAROŚCIAK (Mikrobiologia farmaceutyczna)
PIOTR ZALESKI (Biotechnologia)

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*

Podziękowania

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* składa serdeczne podziękowania dla Recenzentów spoza Rady Redakcyjnej, którzy przyczynili się utrzymania i polepszania standardów naszego czasopisma.

Poniżej przedstawiamy listę recenzentów prac w 2018 roku:

Dr hab. n. med. Tomasz Chmielewski, prof. NIZP-PZH

Dr n. med. Paweł Grzesiowski

Prof. dr hab. Katarzyna Jagusztyn-Krynicka

Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz

Dr hab. Edyta Lipińska

Dr Anna Łasica

Dr hab. Katarzyna Paraszkiewicz, prof. UŁ

Dr hab. med. Lidia Piechowicz, prof. GUMed

Dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS

Dr hab. Marta Wróblewska

Dr hab. n. med. Aleksandra A. Zasada, prof. NIZP-PZH

Ministry of Science
and Higher Education

Zakup numerów DOI dla publikowanych artykułów
oraz profesjonalne tłumaczenie artykułów z języka polskiego na angielski

– zadania finansowane w ramach umowy 659/P-DUN/2018
ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
przeznaczonych na działalność upowszechniających naukę.

Wersja anglojęzyczna wydrukowanych w bieżącym zeszycie artykułów
jest dostępna w archiwum internetowym czasopisma pod adresem:
http://pm.microbiology.pl/category/numery/2018-4

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 301–312
http://www.pm.microbiology.pl

NIEANTYBIOTYKOWE ZASTOSOWANIA ANTYBIOTYKÓW

Maciej Danielewski*, Dorota Ksiądzyna, Adam Szeląg

Katedra i Zakład Farmakologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano we wrześniu 2018 r.

Streszczenie: Antybiotyki są szeroko stosowaną grupą leków w terapii chorób zakaźnych. Niektóre z antybiotyków posiadają właściwości inne niż przeciwdrobnoustrojowe, które coraz częściej są wykorzystywane w leczeniu chorób nieinfekcyjnych. Autorzy uważają, że jest to jedna z przyczyn rozpowszechniania się antybiotyków w środowisku i tym samym zwiększania się ryzyka powstawania oporności. Trzeba pamiętać, że wraz z postępem w nauce i poznawaniem nowych właściwości antybiotyków, każde rozszerzenie wskazań dla leków przeciwbakteryjnych może spowodować powstanie ograniczeń w pierwotnych wskazaniach. Nie zawsze postęp w nauce oznacza postęp w terapii. Czasami może być odwrotnie i należy umieć ocenić bilans zysków i ewentualnych strat. Celem niniejszego opracowania było przedstawienie właściwości antybiotyków innych niż przeciwbakteryjne, które są lub mogą być wykorzystane w terapii chorób nieinfekcyjnych, także po to, aby można było ocenić odległe skutki rozszerzenia wskazań dla leków stosowanych na co dzień w terapii chorób infekcyjnych. Ponieważ tego typu tematyka w sposób zbiorczy nie była dotąd szeroko podejmowana, autorzy postanowili zebrać i podsumować w jednym opracowaniu najważniejsze i najczęściej wykorzystywane oraz najbardziej obiecujące doniesienia dotyczące nieantybiotykowych zastosowań antybiotyków. Niniejsza praca przedstawia najnowsze dane dotyczące prokinetycznego działania erytromycyny, przeciwzapalnego i immunomodulującego działania azytromycyny, potencjalne zastosowanie doksycykliny jako środka przeciwnowotworowego i przeciwzapalnego, a także przeciwzapalne, neuroprotekcyjne, antyoksydacyjne i antyapoptotyczne właściwości minocykliny. Scharakteryzowano również podstawy wykorzystania demeklocykliny w leczeniu zespołu niewłaściwego wydzielania hormonu antydiuretycznego, a także rifaksyminy jako leku o działaniu przeciwzapalnym i eubiotycznym. Opisano ponadto neuroprotekcyjne działanie ceftriaksonu oraz przeciwzapalne i immunostymulujące właściwości fusafunginy.

1. Wprowadzenie – antybiotyki jako potencjalnie skuteczne leki w terapii chorób nieinfekcyjnych. 2. Erytromycyna – działanie prokinetyczne. 3. Azytromycyna – działanie przeciwzapalne i immunomodulujące. 4. Doksycyklina – działanie przeciwnowotworowe i przeciwzapalne. 5. Minocyklina – działanie przeciwzapalne, neuroprotekcyjne, antyoksydacyjne i antyapoptotyczne. 6. Demeklocyklina – działanie antagonistyczne do hormonu antydiuretycznego. 7. Rifaksymina – działanie przeciwzapalne/eubiotyk. 8. Ceftriakson – działanie neuroprotekcyjne. 9. Fusafungina – działanie przeciwzapalne i immunostymulujące. 10. Podsumowanie

NON-ANTIBIOTIC USE OF ANTIBIOTICS

Abstract: Antibiotics are widely used medicines in the treatment of infectious diseases. However, some of them show also non-antibiotic properties, which are increasingly used in the treatment of non-infectious diseases. The authors of this publication believe that this is one of the reasons behind antibiotic dissemination in the environment and, *ipso facto,* behind the increasing risk of bacterial resistance. It is worth remembering that, along with the progress in science and better knowledge of the new properties of antibiotics, every extension of indications for antimicrobial agents may restrict their primary indications. Progress in science does not always mean progress in therapy. In fact, it may sometimes have an opposite effect and we should be able to assess the benefit/risk ratio. The aim of this study was to present other than antibacterial properties of antibiotics which currently are or may be used in the future in the treatment of non-infectious diseases, as well as to assess the long-term effects of extending the indications for medicines commonly used in the treatment of infectious diseases. To the best of the authors' knowledge, such attempt has not been made so far, therefore authors decided to review the most important, useful or promising reports on non-antibiotic use of antibiotics. The article summarizes the latest data on prokinetic action of erythromycin, anti-inflammatory and immunomodulatory action of azithromycine, potential use of doxycycline as an anti-cancer and anti-inflammatory agent, and also anti-inflammatory, neuroprotective, antioxidant and antiapoptotic properties of minocycline. Futhermore, the basics of demeclocycline application in the treatment of inappropriate antidiuretic hormone hypesecretion syndrome and rifaximin use as an anti-inflammatory and eubiotic agent are presented. Neuroprotective action of ceftriaxone and anti-inflammatory and immunostimulatory action of fusafungine were also described.

1. Introduction – antibiotics as potentially effective agents in the therapy of non-infectious diseases. 2. Erythromycine – prokinetic action. 3. Azithromycine – anti-inflammatory and immunomodulatory action. 4. Doxycycline – anticancer and anti-inflammatory action. 5. Minocycline – anti-inflammatory, neuroprotective, antioxidant and antiapoptotic action. 6. Demeclocycline – inhibition of the anti-antidiuretic hormone action. 7. Rifaximin – anti-inflammatory action / eubiotic. 8. Ceftriaxone – neuroprotective action. 9. Fusafungine – anti-inflammatory and immunostimulatory action. 10. Summary

Słowa kluczowe: antybiotyki, choroby niezakaźne, nietypowe wskazania
Key words: antibiotics, non-infectious diseases, atypical indications

1. Wprowadzenie – antybiotyki jako potencjalnie skuteczne leki w terapii chorób nieinfekcyjnych

Antybiotyki są szeroko stosowaną grupą leków w terapii chorób zakaźnych. Wiele ze znanych i powszechnie wykorzystywanych antybiotyków wykorzystuje się w farmakoterapii infekcji od wielu lat. Często już w trakcie stosowania ich w antybiotykoterapii odkrywa się ich dodatkowe właściwości, które stwarzają nowe wskazania do zastosowania tych leków.

Nierzadko do alternatywnego wykorzystania antybiotyków prowadzi analiza działań niepożądanych,

* Autor korespondencyjny: Maciej Danielewski, Katedra i Zakład Farmakologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Jana Mikulicza-Radeckiego 2, 50-345 Wrocław; tel. 71 784 14 50; e-mail: maciej.danielewski@umed.wroc.pl

które można przekuć w pozytywny efekt terapeutyczny. Ponadto, panujący obecnie trend ograniczania antybiotykoterapii ze względu na rosnącą lekooporność szczepów bakteryjnych wymusza na producentach antybiotyków konieczność poszukiwania nowych, niezakaźnych zastosowań dla produkowanych przez nich leków przeciwbakteryjnych. Ważną rolę w odkrywaniu nieantybiotykowych właściwości antybiotyków spełniają niewątpliwie badania kliniczne IV fazy oraz postęp, także techniczny, w dziedzinie nauk podstawowych, który przekłada się na lepsze poznanie patogenezy chorób czy mechanizmów działania leków. Czasem o odkryciu nowych właściwości antybiotyków, jak to często dzieje się w nauce, może także decydować przypadek.

W niniejszym artykule autorzy postanowili opisać działania inne niż przeciwbakteryjne niektórych antybiotyków stosowanych na co dzień przede wszystkim w terapii chorób infekcyjnych.

2. Erytromycyna – działanie prokinetyczne

Erytromycyna, antybiotyk zaliczany do makrolidów, została wyizolowana z grzybów *Actinomycetae* w próbce ziemi z Filipin w 1952 r. [58]. Przez wiele lat była stosowana w farmakoterapii i mimo pojawienia się kolejnych, syntetycznych leków o podobnej budowie, wciąż znajduje swoje miejsce w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Częste działania niepożądane erytromycyny ze strony przewodu pokarmowego, takie jak nudności, wymioty, biegunka, kolkowe bóle brzucha początkowo przypisywano zaburzeniom składu ilościowego i jakościowego mikroorganizmów tworzących mikrobiotę jelit. W 1984 r. wykazano – w badaniach na psach – bezpośredni pobudzający wpływ erytromycyny podanej dożylnie na perystaltykę przewodu pokarmowego, tj. wywoływanie skurczów rozpoczynających się w bliższej części żołądka i ulegających propagacji aż do jelita krętego [68]. Po dożylnym wlewie erytromycyny stwierdzono zwiększenie stężenia motyliny w surowicy oraz aktywności elektrycznej poprzedzającej pojawienie się wędrującego kompleksu motorycznego (Migrating Motor Complex, MMC) od żołądka do jelita krętego [34]. Sarna i wsp. potwierdzili u ludzi, że erytromycyna podana we wlewie dożylnym w dawce 1–3 mg/kg m.c./godz. pobudza powstanie aktywności skurczowej typowej dla III fazy MMC [79]. Erytromycyna u zdrowych osób skraca czas pasażu ustno – kątniczego [50]. Ponadto ten antybiotyk zwiększa ciśnienie dolnego zwieracza przełyku na czczo i po posiłku, ale nie wpływa znacząco na perystaltykę trzonu przełyku [36]. Erytromycyna przyspiesza również opróżnianie żołądkowe. Kurczliwość pęcherzyka żółciowego w okresie międzyposiłkowym zależy m.in. od aktywności motorycznej okolicy przedodźwiernikowej żołądka i dwunastnicy. Pęcherzyk żółciowy częściowo opróżnia się z żółci synchronicznie z MMC. Wykazano, że erytromycyna podana doustnie zmniejsza objętość pęcherzyka żółciowego na czczo i po płynnym posiłku testowym [9]. Erytromycyna podana dożylnie w dawce 200 mg osobom zdrowym zwiększa amplitudę i czas trwania skurczów zwieracza Oddiego [4].

Ustalono, że erytromycyna wpływa na motorykę układu pokarmowego przez pobudzanie receptorów motylinowych [20, 65]. Motylina jest 22-aminokwasowym peptydem wytwarzanym przez komórki neuroendokrynne błony śluzowej dwunastnicy i jelita czczego, który pobudza skurcz mięśni gładkich żołądka i jelit. Reguluje aktywność skurczową przewodu pokarmowego poprzez cykliczne zmiany stężenia w surowicy. Motylina pobudza heterogenne receptory motylinowe występujące w największej ilości w części przedodźwiernikowej żołądka. Erytromycyna oraz inne antybiotyki makrolidowe zawierające 14 atomów węgla w pierścieniu laktonowym oraz azytromycyna (15 atomów węgla w pierścieniu laktonowym) są agonistami receptora motylinowego [5, 12]. Erytromycynę i jej pochodne działające agonistycznie na receptory motylinowe określa się mianem motylidów.

Erytromycyna działa prokinetycznie w dawkach mniejszych niż stosowane w antybiotykoterapii, wynoszących ¼ lub mniej dawki dobowej. Wpływ na perystaltykę układu pokarmowego pojawia się po podaniu doustnym i dożylnym tego leku.

W patogenezie wielu schorzeń układu pokarmowego u dzieci i dorosłych występują zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego. Ponadto niektóre choroby układowe, np. cukrzyca, mogą wtórnie prowadzić do powikłań gastroenterologicznych, np. w postaci gastroparezy [46]. Dodatkowo, krótkotrwałe pobudzenie perystaltyki przewodu pokarmowego ułatwia wykonanie niektórych procedur diagnostyczno-terapeutycznych, stąd zapotrzebowanie na skuteczne leki prokinetyczne. Erytromycyna ma silniejsze działanie prokinetyczne niż powszechnie znane leki, takie jak cyzapryd, domperidon czy metoklopramid [88]. Dlatego po odkryciu właściwości motorycznych erytromycyny badano możliwości jej zastosowania w celach diagnostyczno-terapeutycznych u dzieci i dorosłych. Ustalono, że erytromycyna podana doustnie w dawce jednorazowej 1 mg/kg m.c. u dzieci przed tonsillektomią była tak samo skuteczna jak metoklopramid podany doustnie w dawce 0,15 mg/kg m.c. w pobudzaniu opróżniania żołądka, tj. nie stwierdzono różnicy w częstości występowania wymiotów po tonsillektomii u dzieci, którym przed zabiegiem profilaktycznie podano erytromycynę, w porównaniu do dzieci, którym podano metoklopramid [97]. Inne potencjalne możliwości wykorzystania działania prokinetycznego erytromycyny u dzieci to m.in. zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego

wynikające z jego niedojrzałości u wcześniaków, zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego u niemowląt poddanych operacjom brzusznym, zwłaszcza u tych z małą masą urodzeniową czy choroba refluksowa [15].

Wskazań dla erytromycyny jako prokinetyku u dorosłych jest więcej, np. choroba refluksowa, gastropareza cukrzycowa, gastropareza po wagotonii, dyspepsja czynnościowa pod postacią zespołu zaburzeń poposiłkowych wg kryteriów rzymskich IV, zaparcia, pooperacyjne zaburzenia perystaltyki przewodu pokarmowego, idiopatyczna rzekoma niedrożność jelit, żywienie enteralne, procedury diagnostyczno-terapeutyczne, np. wprowadzenie zgłębnika nosowo-żołądkowego i do jelita cienkiego, badanie endoskopowe górnego odcinka przewodu pokarmowego czy endoskopia kapsułkowa. Szczególnym, nierozwiązanym do dzisiaj problemem terapeutycznym, jest gastropareza cukrzycowa, która nie tylko powoduje dokuczliwe objawy, np. uczucie wczesnej sytości, uczucie pełności w nadbrzuszu, wzdęcia, nudności i wymioty [47], ale pogarsza również kontrolę glikemii. Jej różnie nasilone objawy zgłasza 27–58% pacjentów chorujących na cukrzycę, zwłaszcza typu 1 [90]. Cyzapryd, lek z którym początkowo wiązano duże nadzieje w terapii przewlekłych zaburzeń motoryki przewodu pokarmowego, w tym gastroparezy, został w 1999 r. wycofany z rynku amerykańskiego przez Agencję Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA) z powodu udokumentowanych zgonów wskutek tachyarytmii komorowych. W wielu krajach europejskich podjęto podobne decyzje, choć w Polsce jest dostępny. Z kolei metoklopramid ze względu na ryzyko rozwoju objawów pozapiramidowych stosuje się tylko doraźnie, ponieważ nie nadaje się do przewlekłej farmakoterapii, a Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency, EMA) w 2013 r. zaleciła ograniczenie wskazań do jego stosowania wyłącznie do profilaktyki i leczenia nudności i wymiotów oraz ograniczenie jego dawki dobowej i czasu stosowania u dorosłych do odpowiednio, 30 mg i 5 dni. Dzieciom po 1 r.ż. metoklopramid może być podany wyłącznie, gdy stosowanie innych leków jest nieskuteczne lub niemożliwe, co w praktyce ogranicza wskazania niemal wyłącznie do profilaktyki opóźnionych nudności i wymiotów po chemioterapii i radioterapii nowotworów oraz do ich objawowego leczenia, w tym nudności i wymiotów związanych z ostrym napadem migreny u dorosłych oraz u młodzieży (15–18 lat) po chemioterapii nowotworów (jako lek drugiego rzutu). Domperidon w Polsce jest praktycznie niedostępny. Z kolei EMA uznała, że tegaserod (prokinetyk, częściowy agonista receptora 5-HT4) ma większe ryzyko działań niepożądanych niż korzyści terapeutycznych i wydała negatywną opinię dotyczącą rejestracji tego preparatu w krajach Unii Europejskiej.

Mimo niewątpliwych zalet erytromycyny, tj. udokumentowanej skuteczności jako leku prokinetycznego i korzystnego profilu bezpieczeństwa w porównaniu do wyżej wymienionych prokinetyków, możliwości praktycznego jej zastosowania, zwłaszcza w leczeniu przewlekłym, są ograniczone. Korzystny wpływ erytromycyny na motorykę przewodu pokarmowego zmniejsza się szybko w czasie regularnego stosowania z powodu tachyfilaksji [74]. Erytromycyna jest na ogół dobrze tolerowana, ale występuje ryzyko hepatotoksyczności i licznych interakcji lekowych (inhibitor cytochromu P450 – CYP3A4) [16].

Wydaje się, że największą przeszkodą w powszechnym stosowaniu erytromycyny jako leku prokinetycznego jest jej aktywność przeciwbakteryjna. Erytromycyna, jako prokinetyk, jest podawana w dawkach mniejszych niż stosowane w antybiotykoterapii, co prowadzi do selekcji szczepów opornych. Ma to szczególne znaczenie u pacjentów oddziałów intensywnej opieki medycznej. Zaleca się u nich wczesne wdrożenie żywienia dojelitowego, np. w ciągu 24–48 godz. od przyjęcia na oddział, aby zwiększyć przepływ krwi w jelitach, poprawić czynność bariery jelitowej, przyspieszyć gojenie ran, zmniejszyć ryzyko sepsy i, ostatecznie, poprawić rokowanie [21]. Jednak zaburzona motoryka górnego odcinka przewodu pokarmowego może sprzyjać aspiracji treści żołądkowej do dróg oddechowych i związanym z tym powikłaniom, np. zapaleniu płuc u sztucznie wentylowanych. Erytromycyna w dawkach prokinetycznych ułatwia wprowadzenie zgłębnika do żywienia enteralnego i poprawia jego tolerancję poprzez zmniejszenie objętości treści pokarmowej zalegającej w żołądku, ale w dawkach subterapeutycznych w odniesieniu do działania przeciwbakteryjnego promuje rozwój szczepów opornych, np. szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę. Zastosowanie erytromycyny w małych dawkach zwiększa także ryzyko powikłań – biegunki i innych problemów zdrowotnych spowodowanych przez nadkażenia bakterią *Clostridium difficile* [39, 64, 94].

Azytromycyna, po podaniu jako prokinetyk osiąga stężenie mieszczące się w zakresie stężeń terapeutycznych w leczeniu przeciwbakteryjnym i dlatego podejmowano próby wykorzystania jej właściwości prokinetycznych [5]. Postulowano jej zastosowanie w leczeniu zaburzeń motoryki w chorobie refluksowej, u pacjentów po przeszczepie płuca i z przepukliną rozworu przełykowego [60, 76]. Jej zaletą w porównaniu do erytromycyny ma być niewystępowanie tachyfilaksji [60]. W praktyce, przy zastosowaniu azytromycyny występują objawy niepożądane i ryzyko antybiotykooporności.

Poszukiwanie nowych motylidów, związków równie skutecznych w pobudzaniu perystaltyki jelit jak erytromycyna, ale pozbawionych działania przeciwbakteryjnego, póki co nie zakończyło się sukcesem. Substancja ABT-229 u pacjentów z cukrzycą typu 1 zmniejsza objawy gastroparezy w mniejszym stopniu niż placebo, a w większych dawkach nasila dolegliwości [90]. W tej

sytuacji wydaje się, że zasadne jest praktyczne wykorzystanie właściwości prokinetycznych erytromycyny w procedurach diagnostycznych, ale nie w przewlekłej farmakoterapii. Erytromycyna podana dożylnie w pojedynczej dawce przed esofagogastroduodenoskopią wykonywaną w trybie pilnym u pacjentów z objawami masywnego krwawienia z górnego odcinka przewodu pokarmowego przyspiesza przemieszczenie wynaczynionej krwi dystalnie, co poprawia widoczność błony śluzowej, ułatwia zlokalizowanie źródła krwawienia i jego zatamowanie. Zastosowanie erytromycyny wyraźnie poprawia komfort badania i zwiększa jego bezpieczeństwo, zmniejszając ryzyko zachłyśnięcia podczas endoskopii [23]. Zgodnie z polskimi wytycznymi dotyczącymi postępowania w krwawieniu z górnego odcinka przewodu pokarmowego pochodzenia nieżylakowego, przed endoskopią w trybie pilnym zaleca się podanie erytromycyny w dawce 3 mg/kg m.c. (w praktyce 250 mg) w jednorazowej iniekcji lub w trwającym 30 min. wlewie kroplowym 30–60 min. przed badaniem [56]. Erytromycyna opróżnia żołądek z krwi i skrzepów, poprawia subiektywną jakość badania oraz zmniejsza konieczność powtórzenia endoskopii z powodu niedostatecznego uwidocznienia zmian w górnym odcinku przewodu pokarmowego [7, 14].

Wydłużenie czasu pasażu żołądkowego kapsułki endoskopowej, która ma baterię o ograniczonej żywotności, może skutkować niekompletnym badaniem jelita cienkiego. Erytromycyna w dawce 250 mg podana doustnie godzinę przed połknięciem kapsułki endoskopowej u pacjentów poddanych endoskopii kapsułkowej skraca czas pasażu kapsułki [52]. W tym badaniu średni czas pasażu żołądkowego u pacjentów po erytromycynie wyniósł 15,8 min., a u pozostałych aż 70,2 min. Podanie erytromycyny nie upośledza jakości obrazu.

3. Azytromycyna – działanie przeciwzapalne i immunomodulujące

Azytromycyna, związek zaliczany do azalidów – antybiotyków makrolidowych II generacji, jest obecnie jednym z częściej stosowanych antybiotyków, szczególnie w zakażeniach górnych i dolnych dróg oddechowych. Wykorzystywana jest ona także w terapii zakażeń wywoływanych przez *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae.* Azytromycyna kumuluje się w komórkach makrofagów, osiągając duże stężenie w miejscu zakażenia. Dzięki temu uzyskuje się efekt poantybiotykowy, który umożliwia stosowanie azytromycyny w krótkotrwałej terapii oraz podawanie leku raz na dobę.

Astma oskrzelowa to przewlekła choroba układu oddechowego, która charakteryzuje się napadami przejściowego zwężenia dróg oddechowych i ich nadreaktywnością na różne czynniki prowadzące do skurczu mięśniówki gładkiej oskrzeli. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat zwiększa się liczba zachorowań na dychawicę oskrzelową [19, 95]. Opisano wiele klinicznych podtypów astmy i uważa się, że w terapii należy je uwzględniać [95]. Przykładowo, często w zaostrzeniu astmy u dzieci i dorosłych odgrywają rolę bakterie atypowe, m.in. *C. pneumoniae* i *M. pneumoniae*, a także zakażenia wirusowe, np. rhinowirusami (HRV) [3, 19, 30, 95]. Dlatego w ostatnich latach zaczęto stosować makrolidy jako leki uzupełniające w zaostrzeniach choroby.

Działanie przeciwbakteryjne makrolidów prowadzi bezpośrednio lub pośrednio do zmian układu immunologicznego (działanie immunomodulujące) i efektów przeciwzapalnych [30, 95]. W tym celu najczęściej stosuje się azytromycynę, ze względu na korzystne właściwości farmakokinetyczne oraz rzadkie występowanie działań niepożądanych. Mechanizm działania immunomodulującego i przeciwzapalnego azytromycyny nie został dokładnie poznany. Sugeruje się hamowanie produkcji cytokin, np. interleukiny-8 (IL-8), zmniejszanie stężenia neutrofilów, a także zaburzanie metabolizmu komórek zapalnych związanych z patogenezą dychawicy oskrzelowej [3, 32]. Azytromycyna może indukować u osób chorych (ale nie u zdrowych) wytwarzanie interferonu beta (IFN-β) – endogennej substancji o działaniu przeciwwirusowym, antyproliferacyjnym i immunomodulującym. Zwiększoną produkcję IFN-β zobserwowano w modelach *in vitro* i *in vivo* [59].

Wyniki badań klinicznych nad zastosowaniem makrolidów w terapii zaostrzeń dychawicy nie są jednoznaczne. W 2012 roku, w badaniu AZMATICS nie wykazano korzyści z ich stosowania w astmie o lekkim bądź średnim nasileniu, ale u połowy leczonych z powodu astmy o ciężkim przebiegu zaobserwowano widoczną poprawę jakości życia (Asthma Quality of Life, AQL) przez co najmniej 6 miesięcy [30]. Tych korzystnych działań azytromycyny nie potwierdzają jednak wyniki badania AZALEA [40]. Natomiast metaanaliza 12 randomizowanych badań przeprowadzona w 2013 roku, wskazuje na korzystne działanie długotrwałego podawania makrolidów w terapii astmy u dzieci i dorosłych. Korzyści te dotyczą poprawy wielkości szczytowego przepływu wydechowego (Peak Expiratory Flow, PEF), zmniejszenia podstawowych objawów astmy (kaszlu, duszności, świszczącego oddechu), poprawy jakości życia (AQL) i zmniejszenia nadreaktywności dróg oddechowych. Nie wykazano natomiast poprawy wielkości natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej (Forced Expiratory Volume, FEV1) [73]. Inne badania wykazały korzystny wpływ terapii makrolidami na objawy astmy i FEV1, ale nie potwierdzono poprawy jakości życia (AQL) [43].

Niejednoznaczne wyniki badań i trudności interpretacyjne powodują, że niełatwo jest sformułować spójne wnioski i zalecenia [30, 31, 40, 95]. Europejskie Towarzystwo Oddechowe (European Respiratory Society,

ERS), jak i jego amerykański odpowiednik (American Thoracic Society, ATS), wskazują na zalecenia stosowania makrolidów jako warunkowe, a istniejące dowody o bardzo małej wartości [95]. Wydaje się zatem, że biorąc pod uwagę ryzyko powstawania antybiotykooporności, nie należy zalecać stosowania makrolidów do czasu przeprowadzenia wiarygodnych badań klinicznych.

4. Doksycyklina – działanie przeciwnowotworowe i przeciwzapalne

Doksycyklina jest długo działającym, półsyntetycznym antybiotykiem z grupy tetracyklin. Posiada szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego, stosowana jest m.in. w zakażeniach wywołanych przez *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp. Wykazuje działanie bakteriostatyczne i przeciwzapalne. Wykorzystywana jest także w leczeniu zakażenia zarodźcem malarii. Doksycyklina hamuje biosyntezę białek bakteryjnych, poprzez wiązanie z rybosomalną podjednostką 30S. Ze względu na podobieństwo strukturalne pomiędzy rybosomami bakteryjnymi i mitochondrialnymi, doksycyklina hamuje także biosyntezę białek w mitochondriach komórek ssaków [17, 18]. Ten efekt można wykorzystać w leczeniu nowotworów.

Ważną rolę w progresji nowotworu odgrywają zależne od cynku enzymy proteolityczne – metaloproteinazy macierzy (Matrix Metalloproteinases, MMP). Pobudzają one proliferację komórek nowotworowych, ich migrację, inwazję, tworzenie przerzutów oraz angiogenezę. Innym procesem nasilającym rozwój nowotworów jest przejście epitelialno-mezenchymalne (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT). Proces EMT może sprzyjać przekształceniu nowotworu niezłośliwego w jego agresywną i inwazyjną postać. Doksycyklina wykazuje zdolność hamowania zarówno aktywności MMP – poprzez chelatowanie jonów cynku i wapnia, jak i procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego – poprzez inhibicję aktywności czynników transkrypcyjnych, w tym przede wszystkim czynnika jądrowego κB (Nuclear Factor κB, NF-κB) [66, 72, 91, 98, 99].

Przeprowadzone badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że na poziomie molekularnym doksycyklina działa przeciwnowotworowo m.in. poprzez wiązanie z receptorem PAR1. Receptor ten odpowiada m.in. za aktywację czynnika jądrowego NF-κB. Odgrywa on ważną rolę w proliferacji guza nowotworowego, poprzez regulację ekspresji wielu genów kodujących różne białka. Doksycyklina, poprzez zablokowanie receptora PAR1, hamuje czynność NF-κB. Następstwem tego jest zmniejszenie wytwarzania miRNA oraz zwiększenie stężenia nabłonkowej E-kadheryny, która hamuje progresję EMT i zmniejsza zdolność do przerzutów na przykład nowotworu piersi [99]. W obrębie zmian nowotworowych istnieje mała populacja komórek, która posiada zdolność do samoodnawiania się. Komórki te wykazują oporność na konwencjonalną terapię, a także pełnią kluczową rolę w procesach wzrostu guza, tworzenia przerzutów oraz nawrotów choroby nowotworowej. Są one określane mianem nowotworowych komórek macierzystych (Cancer Stem Cells, CSC). Doksycyklina jest selektywnym inhibitorem CSC, hamuje proliferację nowotworowych komórek macierzystych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [18, 57, 66].

Doksycyklina reguluje odpowiedź na uszkodzenie DNA (w tym naprawę DNA przez kinazę proteinową DNA-PK), odgrywa także rolę w supresji różnych ścieżek rozwojowych nowotworu i procesu EMT. Wszystkie te procesy są nasilane przez nowotworowe komórki macierzyste i warunkują wytworzenie oporności na konwencjonalną terapię oraz apoptozę typu *anoikis*, co prowadzi do powstania krążących komórek nowotworowych (Circulating Tumor Cells, CTC) i zwiększenia ryzyka tworzenia przerzutów nowotworowych. Komórki te wykazują zdolność przetrwania w warunkach nieadhezyjnych, co pozwala im stosunkowo swobodnie krążyć w systemie naczyń krwionośnych [66]. Autofagia, czyli degradacja zbędnych organelli komórkowych, może odgrywać ważną rolę w procesie kancerogenezy. Komórki nowotworowe, które dzielą się w sposób niekontrolowany, mogą w przypadku niedoboru substancji odżywczych wykorzystywać proces autofagii do pozyskiwania energii. Ma to znaczenie, gdy szybko rosnący guz nie wykształcił, w procesie angiogenezy, odpowiedniego systemu unaczynienia. Doksycyklina może zmniejszać ekspresję markerów LC-3BI i LC-3BII, odpowiedzialnych za proces autofagii [98].

Tetracykliny mają zdolność do zwiększania ekspresji fosfataz fosforanów lipidów (Lipid-Phosphate Phosphatases, LPP) na powierzchni komórek. Fosfatazy te odpowiadają za degradację krążącego kwasu lizofosfatydowego (Lysophosphatidic Acid, LPA), który powstaje z lizofosfatydylocholiny pod wpływem autotaksyny (Autotaxin, ATX). Efektem działania krążącego LPA jest nasilenie związanego z nowotworem stanu zapalnego, a także zwiększona proliferacja, migracja, przeżywalność i oporność komórek nowotworowych na cytostatyki. W nowotworach złośliwych LPA przyspiesza wzrost masy guza, angiogenezę i tworzenie przerzutów [37]. LPA wiąże się z receptorami na powierzchni komórek, zwiększa ekspresję prozapalnych cytokin, chemokin i innych białek. W efekcie zwiększa się stężenie m.in. IL-1β, IL-6, IL-9, CCL2, CCL11, CXCL1, CXCL2, CXCL9, G-CSF, LIF, VEGF w komórkach guza. Leczenie doksycykliną, poprzez zwiększenie stężenia LPP, zmniejsza osoczowe stężenie krążącego LPA i innych mediatorów stanu zapalnego [91].

W 2017 roku wykazano, że doksycyklina zmniejsza formowanie MAM (Mitochondria-Associated Membranes), wywołując stres retikulum endoplazmatycznego,

a w konsekwencji apoptozę komórek [57]. MAM to błony związane z mitochondriami, które powstają przy zwiększonej aktywności mitochondrialnych łańcuchów oddechowych w komórkach. Badania prowadzono na modelu nowotworu prostaty (agregaty komórek nowotworowych hodowane w warunkach *in vitro*, wykazujące cechy guza rosnącego w warunkach *in vivo* we wczesnej fazie jego rozwoju). Przy długotrwałym podawaniu doksycykliny, może dochodzić do selekcji komórek nowotworowych z dominującym fenotypem glikolitycznym. Powoduje to powstanie oporności na antybiotyk, polegającej na zwiększeniu stabilności metabolicznej komórek, które mogą wykorzystywać procesy glikolizy jako źródło energii. Stąd wykorzystanie doksycykliny – hamującej procesy mitochondrialnego oddychania komórkowego, a także witaminy C – ograniczającej rozkład glikolityczny [17]. Ta stosunkowo prosta i mało toksyczna dla pacjenta terapia, może okazać się skutecznym sposobem usuwania z organizmu opornych nowotworowych komórek macierzystych. Większość stosowanych cytostatyków ma dużą toksyczność i jest źle tolerowana przez pacjentów. Doksycyklina mogłaby zmniejszyć toksyczność stosowanej terapii przez ograniczenie liczby opornych komórek macierzystych i tym samym umożliwić zmniejszenie dawek leków cytostatycznych. Dotychczas potwierdzono, że może ona okazać się wartościową alternatywą w terapii m.in. nowotworów płuc, piersi, prostaty i kostniakomięsaków [57, 72, 98, 99]. Wskazane są inne badania, w tym także kliniczne, które potwierdziłyby przydatność doksycykliny we wspomaganiu leczeniu nowotworów [66].

Doksycyklina jest także potencjalnie skutecznym środkiem o działaniu przeciwzapalnym. Jednym z istotnych czynników patologicznych chorób, w przebiegu których dochodzi do degeneracji tkanek (np. reumatoidalnym zapaleniu stawów, cukrzycy, pęcherzowych chorobach dermatologicznych, wrzodach rogówki czy zapaleniu przyzębia) jest nadmierna kolagenoliza [75]. Za proces kolagenolizy odpowiadają m.in. kolagenazy – białka z grupy metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej. Tetracykliny wykazują zdolność do bezpośredniego hamowania (poprzez chelatowanie jonów cynku i wapnia) aktywności metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, czyli zależnych od cynku i wapnia enzymów proteolitycznych, do których zalicza się m.in. kolagenazy czy żelatynazy [75, 83, 85, 96]. Zaobserwowano, że równocześnie dochodzi do zmniejszenia stężenia mRNA dla tych enzymów, co sugeruje bezpośredni wpływ tetracyklin na ekspresję genów dla niektórych kolagenaz i żelatynaz [83]. Dotychczas wykazano skuteczność doksycykliny w zmniejszaniu aktywności m.in. MMP-8, istotnej w patogenezie miażdżycy i chorób przyzębia [85], MMP-9 przyspieszającej progresję mukowiscydozy [96], a także MMP-1 i MMP-13 produkowanych w nadmiarze w chondrocytach w przebiegu zapalenia kości i stawów [83].

W przeprowadzonych badaniach klinicznych stwierdzono, że terapia niskimi dawkami doksycykliny (mniejszymi niż w przypadku działania antybiotycznego) istotnie zmniejsza aktywność kolagenazy w dziąsłach oraz płynie dziąsłowym i przeciwdziała rozchwianiu zębów w przypadku zapalenia przyzębia u dorosłych [27, 28, 75]. Co ważne, w trakcie tego typu terapii nie zaobserwowano pojawiania się lekooporności u mikroorganizmów. Podobne efekty pojawiały się także po podawaniu niskich dawek minocykliny [26]. Zaobserwowano także, że niskie, dobrze tolerowane przez pacjentów dawki doksycykliny znacząco hamują aktywność kolagenaz i żelatynaz w przypadku zapalenia kości i stawów [83, 84]. Dodatkowo dowiedziono, że podczas leczenia niskimi dawkami doksycykliny dochodzi do wzrostu stężenia transformującego czynnika wzrostu beta-3 (Transforming Growth Factor Beta-3, TGF-β3) oraz istotnego obniżenia stężenia interleukin IL-1α, IL-1β i IL-6. Ponadto zaobserwowano wzrost ekspresji receptorów RI i RII dla TGF-β3. Zwiększenie stężenia transformującego czynnika wzrostu może przyczyniać się do zmniejszenia produkcji MMP oraz miejscowych prozapalnych cytokin [83].

5. Minocyklina – działanie przeciwzapalne, neuroprotekcyjne, antyoksydacyjne i antyapoptotyczne

Minocyklina jest długo działającą, półsyntetyczną tetracykliną, stosowaną od wielu lat w zwalczaniu zakażeń bakteriami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi, szczególnie w terapii trądziku młodzieńczego oraz niektórych chorób przenoszonych drogą płciową. Oprócz działania bakteriostatycznego, w wielu badaniach potwierdzono skuteczność minocykliny jako środka przeciwzapalnego, neuroprotekcyjnego, antyoksydacyjnego i antyapoptotycznego [1, 48, 62, 80, 93]. Podana doustnie, dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, charakteryzuje się lepszymi parametrami farmakokinetycznymi niż inne tetracykliny, tj. stosunkowo długim okresem półtrwania i łatwą penetracją do tkanek. Łatwo przenika także przez barierę krew-mózg, co ma znaczenie dla jej neuroprotekcyjnego działania [22].

Minocyklina zmienia reaktywność komórek mikrogleju, przeciwdziała procesom zapalnym oraz ogranicza procesy neurodegeneracyjne w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. W eksperymentalnych modelach zwierzęcych potwierdzono jej skuteczność w terapii chorób Parkinsona, Alzheimera, Huntingtona, stwardnienia rozsianego oraz w przypadku bólów neuropatycznych, stanów zapalnych mózgu, udarów, encefalopatii niedotleniowo-niedokrwiennej i w hipomielinizacji [13,

22, 48, 62, 80]. Wykazano, że minocyklina ogranicza zmiany patologiczne w substancji białej i hipokampie oraz poprawia mózgowy przepływ krwi [1, 35]. Przeciwzapalne i neuroochronne działanie minocykliny zależy od zmniejszania ekspresji prozapalnych markerów, które zwiększają aktywność komórek mikrogleju, np. chemokiny CCL2, IL-1β, IL-6, czynnika martwicy nowotworu (Tumor Necrosis Factor, TNF-α) oraz indukowanej syntazy tlenku azotu (Nitric Oxide Synthase, NOS-2, iNOS) w krążeniu systemowym [1, 22, 62, 63, 80]. Nadmierna reaktywność mikrogleju jest uważana za jedną z ważniejszych przyczyn bólu neuropatycznego [63]. Zwiększoną odpowiedź immunologiczną obserwowano także przy zwyrodnieniu siatkówki, w którym komórki mikrogleju uszkadzają fotoreceptory [80].

Właściwości antyoksydacyjne minocykliny zostały potwierdzone m.in. w modelu oceniającym długość życia gatunku muchówek (wywilżna karłowata), traktowanych czynnikiem utleniającym w postaci nadtlenku wodoru. Popularna „muszka owocowa" to często wykorzystywany w badaniach owad z rzędu muchówek, ze względu na krótki okres życia oraz łatwość hodowli. W grupie z minocykliną długość życia owadów była dłuższa, a przeprowadzone analizy potwierdziły, że przyczyną było zwiększenie ich odporności na stres oksydacyjny [48]. Minocyklina działa także antyapoptotycznie, poprzez hamowanie kaspaz. Kaspazy to enzymy z grupy proteaz cysteinowych, które po aktywacji przez sygnały apoptotyczne degradują białka komórkowe. Zmniejszenie aktywności kaspaz przez minocyklinę polega na zmniejszaniu przez nią uwalniania cytochromu C (Cytochrome Complex, Cyt C) z mitochondriów i zahamowaniu aktywności białek apoptotycznych oraz zwiększaniu ekspresji protein antyapoptotycznych, np. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) [1, 80]. W większości badań eksperymentalnych, minocyklina była stosowana w dużych dawkach, większych od zwykle stosowanych u ludzi. To ogranicza praktyczne możliwości wykorzystania jej nieantybiotykowych właściwości w warunkach klinicznych. Nie ma w tym nic dziwnego, bo na ogół dawki stosowane u zwierząt są kilkakrotnie większe niż podawane u ludzi. Należy zatem ustalić i zweryfikować dawkowanie minocykliny i jej działanie na organizm ludzki.

Trzeba też pamiętać, że tetracykliny są hepatotoksyczne i należy to uwzględnić przy długotrwałym stosowaniu minocykliny. Z drugiej strony, antybiotyk ten stosuje się w praktyce przez wiele tygodni w leczeniu schorzeń dermatologicznych. Nowy system podawania leku w formie samosieciującego się hydrożelu, zawierającego polisacharydowe kompleksy chlorowodorku minocykliny z jonami metali, może umożliwić kontrolowane uwalnianie określonej dawki antybiotyku przez dłuższy czas. System ten, wstrzykiwany dooponowo, uwalnia minocyklinę w dawce mniejszej niż standardowo stosowane u ludzi (3 mg/kg m.c.), nie wywołuje miejscowego uszkodzenia tkanki i pozwala na skuteczniejsze zmniejszanie zmian neurodegeneracyjnych, niż w przypadku ogólnego podania wielokrotnie większych dawek leku [93].

6. Demeklocyklina – działanie antagonistyczne do hormonu antydiuretycznego

Demeklocyklina, antybiotyk bakteriostatyczny wyizolowany z *Streptomyces aureofaciens*, należy do tetracyklin. Obecnie jest rzadko stosowana w leczeniu zakażeń bakteryjnych, m.in. z powodu szybkiego narastania na nią oporności, ale jest stosowana w niektórych krajach w zespole niewłaściwego wydzielania hormonu antydiuretycznego (Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Hypersecretion, SIADH), zwanego zespołem Schwartza-Barttera. Przyczyną SIADH jest nadmierne wydzielanie hormonu antydiuretycznego (Antidiuretic Hormone, ADH) przez tylny płat przysadki lub ekotopowo w przebiegu, np. nowotworów: płuc, trzustki, gruczołu krokowego, chłoniaka, grasiczaka czy rakowiaka. Nadmiar ADH zatrzymuje wodę w organizmie przy niezaburzonym wydalaniu sodu przez nerki, co prowadzi do hiponatremii, zmniejszenia osmolarności osocza i wystąpienie objawów neurologicznych, a niekiedy obrzęku mózgu i zgonu pacjenta.

Demeklocyklinę w SIADH po raz pierwszy zastosowano w 1975 r. [11], wykorzystując jej działanie niepożądane, niewystępujące po innych tetracyklinach, czyli moczówkę pochodzenia nerkowego będącą skutkiem zmniejszenia przez ten antybiotyk odpowiedzi komórek kanalików nerkowych na ADH [61]. Prawdopodobnie antybiotyk hamuje cyklazę adenylową i blokuje działanie ADH po połączeniu tego hormonu z receptorem wazopresyny typu 2 w nerkach.

Demeklocyklinę stosowano, gdy leczenie przyczynowe SIADH było nieskuteczne, a ograniczenie podaży płynów i uzupełnienie niedoboru sodu nie przynosiło poprawy [25]. Po podaniu antybiotyku, początkowo w dawce dobowej 900–1200 mg, odpowiedź na leczenie pojawia się po 2–5 dniach. Demeklocyklina jest skuteczna w ok. 60% przypadków [82]. Aktualnie demeklocyklina została zastąpiona w leczeniu hiponatremii przez selektywnych antagonistów receptora wazopresyny typu 2, np. tolwaptan [86].

7. Rifaksymina – działanie przeciwzapalne/eubiotyk

Rifamycyny to grupa antybiotyków stosowana przede wszystkim w leczeniu mykobakterioz, np. gruźlicy czy trądu. Należą do nich: rifampicyna, rifabutyna, rifapentyna i rifaksymina.

Rifaksymina, półsyntetyczna pochodna rifamycyny, jest antybiotykiem bakteriobójczym o szerokim spektrum działania, hamującym syntezę białek bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, tlenowych i beztlenowych. W przeciwieństwie do związku macierzystego – rifamycyny, dzięki obecności dodatkowego pierścienia pirydoimidazolowego, po podaniu doustnym tylko w minimalnym stopniu (mniej niż 1%) wchłania się z przewodu pokarmowego, co przekłada się na bardzo dobrą tolerancję antybiotykoterapii. Wskazaniami do zastosowania rifaksyminy, oprócz infekcji jelit wywołanych przez wrażliwe bakterie (w tym biegunki podróżnych), zespołu przerostu bakteryjnego jelita cienkiego i encefalopatii wątrobowej, są choroba uchyłkowa jelit i postać biegunkowa zespołu jelita nadwrażliwego (Irritable Bowel Syndrome, IBS). Z drugiej strony trzeba pamiętać, że obecnie uważa się, że w leczeniu zakażeń jelit należy stosować leki wchłaniające się z przewodu pokarmowego, stąd dzisiaj w leczeniu biegunek podróżnych zaleca się fluorochinolony lub makrolidy, które dobrze wchłaniają się z przewodu pokarmowego i zapewniają leczenie przeciwbakteryjne poza przewodem pokarmowym.

W badaniu TARGET 1 i TARGET 2 stwierdzono, że rifaksymina stosowana w dawce 550 mg co 8 godz. przez 2 tyg. u pacjentów z niezaparciową postacią IBS zmniejsza dolegliwości, przy czym to działanie utrzymuje się przez min. 12 tyg. po antybiotykoterapii [69]. W związku z tym pojawiła się hipoteza, że rifaksymina zmniejsza odpowiedź prozapalną u pacjentów z IBS, a nie tylko działa przeciwbakteryjnie [70].

Uważa się, ze rifaksymina działa bezpośrednio i pośrednio przeciwzapalnie. U pacjentów z IBS stwierdzono większe stężenia IL-6, IL-8, IL-1β i TNF-α niż u osób zdrowych [41, 54]. Niedobór cytokin przeciwzapalnych i zwiększenie stężenia cytokin prozapalnych w błonie śluzowej jelita mogą prowadzić do osłabienia bariery jelitowej, jej uszkodzenia i ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej, co zostało dobrze udokumentowane u pacjentów z przewlekłymi chorobami zapalnymi jelit. Wiadomo również, że rifaksymina poprzez ograniczenie liczby bakterii jelitowych zmniejsza wytwarzanie amoniaku i innych związków chemicznych, które, jak wiadomo, w marskości wątroby przyczyniają się do rozwoju encefalopatii wątrobowej, przy czym podawana w dawce 400 mg co 8 godz. przez 4 tyg. zmniejsza stężenie IL-6 i TNF-α u pacjentów ze zdekompensowaną marskością tego narządu [42].

Przyjmuje się, że przeciwzapalne właściwości rifaksyminy, tj. zmniejszenie ekspresji cytokin prozapalnych, może być następstwem agonistycznego działania rifaksyminy na receptor X pregnanu (Pregnane X Receptor, PXR) [10]. PXR to jądrowy receptor i jednocześnie czynnik transkrypcyjny regulujący transport i metabolizm leków [44] oraz odpowiedź zapalną i utrzymanie homeostazy błony śluzowej jelit. Jego pobudzenie osłabia przekazywanie sygnału przez jądrowy czynnik κB, a to zmniejsza ekspresję cytokin prozapalnych: IL-1β i TNF-α [6].

W błonie śluzowej jelit pacjentów z IBS stężenie lizofosfatydylocholiny i ceramidów jest większe niż u osób zdrowych. Związki te mogą zmieniać wrażliwość na ból i zmniejszać szczelność bariery jelitowej [41]. Zakłada się, że rifaksymina zmniejsza liczebność bakterii i modyfikuje ich aktywność metaboliczną w przewodzie pokarmowym, czym tłumaczy się m.in. korzystne działanie rifaksyminy u pacjentów z encefalopatią wątrobową [2]. Rifaksymina uważana jest za eubiotyk, ponieważ zabija bakterie chorobotwórcze, ale także zwiększa liczbę bakterii korzystnych dla ludzkiego organizmu w świetle jelit, np. *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp., a tym samym przywraca eubiozę (przeciwieństwo dysbiozy). Rifaksymina zmniejsza także wirulencję patogenów, np. *Shigella sonnei* [38].

Choroba uchyłkowa jelita grubego jest jednym z najczęstszych schorzeń gastroenterologicznych. W patogenezie choroby uchyłkowej i jej powikłań podkreśla się znaczenie m.in. zmian jakościowych i ilościowych mikroflory jelitowej (dysbiozy). U pacjentów z chorobą uchyłkową, w porównaniu do osób z uchyłkowatością, stwierdza się mniejszą liczbę bakterii korzystnych dla organizmu jak *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus* spp. i *Akkermansia* spp. oraz zwiększenie liczby *Bacteroides* i *Prevotella* (rozpad śluzu i osłabienie bariery jelitowej). Zmniejszenie populacji *F. prausnitzii* koreluje z większym naciekiem makrofagów w okolicy uchyłka. Dysbioza aktywuje przewlekłe mikrozapalenie, co zwiększa przepuszczalność bariery jelitowej w obrębie uchyłka i prowadzi do zaburzeń funkcji neuromotorycznych jelit – przerostu mięśni gładkich i zwiększenia wrażliwości trzewnej.

Wytyczne Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii i Towarzystwa Chirurgów Polskich zalecają, aby w objawowej niepowikłanej chorobie uchyłkowej oraz w profilaktyce nawrotów ostrego zapalenia uchyłków jelita grubego stosować rifaksyminę w dawce 400 mg co 12 godzin przez 7 dni, cyklicznie co miesiąc do 12 miesięcy [67]. Po min. 3 cyklach leczenia u większości pacjentów uzyskuje się zmniejszenie bądź ustąpienie objawów niepowikłanej choroby uchyłkowej [87]. Rifaksymina nie tylko zmniejsza objawy, ale również zmniejsza ryzyko powikłań choroby uchyłkowej. Cykliczne leczenie rifaksyminą nie prowadzi do rozwoju oporności bakterii na ten antybiotyk [71].

8. Ceftriakson – działanie neuroprotekcyjne

Ceftriakson jest bakteriobójczym antybiotykiem beta-laktamowym należącym do III generacji cefalosporyn, podawanym pozajelitowo raz na dobę. Jest oporny

na klasyczne beta-laktamazy, ale jest rozkładany przez beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (Extended-Spectrum Beta-Lactamases, ESBL). Działa na wiele gatunków bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz beztlenowych. Stosowany jest m.in. w leczeniu cięższych zakażeń układu moczowego, oddechowego, zakażeń wewnątrz jamy brzusznej, opon mózgowo-rdzeniowych, a także w posocznicy i w profilaktyce zakażeń okołooperacyjnych. W 2005 roku, Rothstein i wsp. zasugerowali, że niektóre antybiotyki beta-laktamowe mogą działać neuroprotekcyjnie. Dotyczyło to szczególnie ceftriaksonu ze względu na jego dobrą penetrację do OUN i osiąganie stężenia leczniczego w płynie mózgowo-rdzeniowym [77].

Jednym z ważniejszych neuroprzekaźników OUN, związanym z procesami nauki i zapamiętywania oraz emocjami, jest glutaminian [81]. U zdrowych osób, glutaminian uwolniony do szczeliny synaptycznej jest szybko z niej reabsorbowany przez otaczające neurony i komórki glejowe, dzięki transporterom aminokwasów (Excitatory Amino Acid Transporters, EAAT), a w szczególności przez podtyp EAAT-2 (GLT-1), który w około 90% odpowiada za wychwyt glutaminianu. Gdy dochodzi do dysfunkcji tego transportera, glutaminian przebywa w przestrzeni synaptycznej w zwiększonej ilości i zbyt długo. Podejrzewa się, że może to przyczyniać się do wystąpienia chorób neurodegeneracyjnych, takich jak m.in. choroba Parkinsona, Alzheimera czy Huntingtona [51, 53, 78]. Nadmiar glutaminianu działa także neurotoksycznie w przebiegu udaru niedokrwiennego mózgu [45, 81]. Transportery glutaminianu, a także system xc- (antyporter glutaminian/cysteina, Cystine/Glutamate Antiporter), odgrywają ważną rolę w utrzymaniu homeostazy mózgu. Ceftriakson zwiększa ekspresję GLT-1, a przez to przyczynia się do utrzymania małego stężenia pozakomórkowego glutaminianu [33, 45, 49]. Dodatkowo, ceftriakson indukuje ekspresję systemu xc-, zwiększając stężenie zewnątrzkomórkowego glutationu, który w mózgu pełni rolę antyoksydacyjną. Ceftriakson zwiększa ponadto uwalnianie glutationu z astrocytów kory mózgowej i rdzenia kręgowego [49, 53]. Te działania ceftriaksonu wzmacniają jego ochronne działanie przed toksycznością glutaminianu [33, 51].

W 2015 roku wykazano, że podawanie ceftriaksonu oraz N-acetylocysteiny zmniejsza wielkość udaru niedokrwiennego mózgu i deficyty neurologiczne u szczurów [45]. Wykazano także, że ceftriakson zmniejsza degenerację neuronów dopaminergicznych w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona i poprawia zaburzoną motorykę u zwierząt. Zaobserwowano również zwiększoną ekspresję transportera GLT-1 [51]. Potencjalną użyteczność ceftriaksonu w leczeniu choroby Parkinsona potwierdzono w modelu *in vitro*. Jednym ze związków odgrywających rolę w inicjacji procesów neurodegeneracyjnych w chorobie Parkinsona jest alfa-synukleina (Alpha-Synuclein) – małocząsteczkowe białko cytozolowe. Wykazano, że ceftriakson wiąże się z alfa-synukleiną i blokuje jej polimeryzację *in vitro*, działając tym samym neuroprotekcyjnie [78].

Opisane powyżej doniesienia i wyniki przeprowadzonych badań doświadczalnych wskazują, że ceftriakson może być przydatny w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, a także w profilaktyce urazów mózgu i zmniejszaniu skutków jego niedokrwienia. Ewentualna skuteczność terapii winna zostać potwierdzona w badaniach klinicznych, ale wiadomo, że może ona zależeć od wielkości niedokrwienia, wieku pacjenta, długości leczenia i dawki antybiotyku [33, 51].

9. Fusafungina – działanie przeciwzapalne i immunostymulujące

Fusafungina, antybiotyk wyizolowany z *Fusarium lateritum*, działa bakteriostatycznie na bakterie takie jak np. *M. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* i *S. aureus*, w tym *S. aureus* metycylinooporny [24]. Dodatkowo fusafungina hamuje rozwój *Candida albicans* oraz adhezję *Hemophilus influenzae* do nabłonka dróg oddechowych. Fusafungina działa także przeciwzapalnie i immunostymulująco [89].

Do niedawna, antybiotyk ten stosowano dość często miejscowo w postaci aerozolu w terapii zakażeń bakteryjnych jamy ustnej, gardła i górnych dróg oddechowych u dorosłych i dzieci powyżej 30 miesiąca życia. W 2016 r. Europejska Agencja Leków zaleciła wycofanie preparatów zawierających ten antybiotyk z rynku z powodu jej małej skuteczności, a jednocześnie dużego ryzyka wystąpienia ciężkich reakcji alergicznych, a także wywoływania oporności na antybiotyki.

10. Podsumowanie

W niniejszym artykule opisane zostały nieantybiotykowe działania mniej lub bardziej powszechnie stosowanych antybiotyków, które można wykorzystać w leczeniu chorób niezakaźnych. Wśród nich dominuje przede wszystkim działanie przeciwzapalne. Niektóre z tych działań wciąż znajdują się w fazie badań na zwierzętach, inne w fazie badań klinicznych, jeszcze inne są już z powodzeniem stosowane w farmakoterapii. Zapewne będą się także pojawiać nowe doniesienia o nieznanych dotąd właściwościach antybiotyków.

Wykorzystanie antybiotyków w chorobach niezakaźnych może okazać się ciekawą alternatywą lub uzupełnieniem dotychczas stosowanej farmakoterapii. Najważniejszym jednak jest, aby tego typu leczenie

opierało się na jednym, fundamentalnym założeniu – aby nieantybiotykowe zastosowanie antybiotyków nie prowadziło do wytworzenia lekooporności mikroorganizmów chorobotwórczych.

Piśmiennictwo

1. Abbaszadeh A., Darabi S., Hasanvand A., Amini-Khoei H., Abbasnezhad A., Choghakhori R., Aaliehpour A.: Minocycline through attenuation of oxidative stress and inflammatory response reduces the neuropathic pain in a rat model of chronic constriction injury. *Iran. J. Basic Med. Sci*. **21**, 138–144 (2018)
2. Bajaj J.S., Gillevet P.M. i wsp.: Modulation of the microbiome by rifaximin in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *PLoS ONE,* **8**, e60042 (2013)
3. Banh H.L.: Unconventional treatment options in severe asthma: an overview. *J. Pharm. Pharm. Sci*. **14**, 387–399 (2011)
4. Beker B., Mujica V., Guelrud M.: Effect of erythromycin on the sphincter of Oddi in healthy volunteers. *Gastroenterology*, **100**, A309 (1991)
5. Broad J., Sanger G.J.: The antibiotic azithromycin is a motilin receptor agonist in human stomach: comparison with erythromycin. *Brit. J. Pharmacol.* **168**, 1859–1867 (2013)
6. Calanni F., Renzulli C., Barbanti M., Viscomi G.C.: Rifaximin: beyond the traditional antibiotic activity. *J. Antibiot*. **67**, 667–670 (2014)
7. Carbonell N., Pauwels A., Serfaty L., Boelle P.Y., Becquemont L, Poupon R: Erythromycin infusion prior to endoscopy for acute upper gastrointestinal bleeding: a randomized, controlled, double-blind trial. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 1211–1215 (2006)
8. Carsenti-Dellamonica H., Galimand M., Vandenbos F., Pradier C., Roger P.M., Dunais B., Sabah M., Mancini G., Dellamonica P.: *In vitro* selection of mutants of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolides and linezolid: relationship with susceptibility to penicillin G and macrolides. *J. Antimicrob. Chemother*. **56**, 633–642 (2005)
9. Catnach S.M., Fairclough P.D., Trembath R.C., O'Donnell L.J.D., McLean A.M., Law P.A., Wickham J.E.A.: Effect of oral erythromycin on gallbladder motility in normal and gallstone subjects. *Gastroenterology*, **102**, 2071–2076 (1992)
10. Cheng J., Shah Y.M., Gonzalez F.J.: Pregnane X receptor as a target for treatment of inflammatory bowel disorders. *Trends Pharmacol. Sci*. **33**, 323–330 (2012)
11. Cherrill D.A., Stote R.M., Birge J.R., Singer I.: Demeclocycline treatment in the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion. *Ann. Int. Med*. **83**, 654–656 (1975)
12. Chini P., Toskes P.P., Waseem S., Hou W., McDonald R., Moshiree B.: Effect of azithromycin on small bowel motility in patients with gastrointestinal dysmotility. *Scand. J. Gastroenterol*. **47**, 422–427 (2012)
13. Choi Y., Suh Y.H. i wsp.: Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 2393–2404 (2007)
14. Coffin B., Valleur P. i wsp.: Erythromycin improves the quality of EGD in patients with acute upper GI bleeding: a randomized controlled study. *Gastrointest. Endosc*. **56**, 174–179 (2002)
15. Curry J.I., Lander T.D., Stringer M.D.: Review article: erythromycin as a prokinetic agent in infants and children. *Aliment. Pharmacol. Ther*. **15**, 595–603 (2001)
16. Dall'Antonia M., Wilks M., Coen P.G., Bragman S., Millar M.R.: Erythromycin for prokinetics: imprudent prescribing? *Crit. Care*, **10**, 112 (2006)
17. De Francesco E.M., Bonuccelli G., Maggiolini M., Sotgia F., Lisanti M.P.: Vitamin C and Doxycycline: A synthetic lethal combination therapy targeting metabolic flexibility in cancer stem cells (CSCs). *Oncotarget*, **40**, 67269–67286 (2017)
18. De Francesco E.M., Maggiolini M., Tanowitz H.B., Sotgia F., Lisanti M.P.: Targeting hypoxic cancer stem cells (CSCs) with Doxycycline: Implications for optimizing anti-angiogenic therapy. *Oncotarget*, **34**, 56126–56142 (2017)
19. Demoly P., Gueron B., Annunziata K., Adamek L., Walters R.D.: Update on asthma control in five European countries: results of a 2008 survey. *Eur. Respir. Rev*. **116**, 150–157 (2010)
20. Depoortere I., Peeters T.L., Matthijs G., Vantrappen G.: Macrolides antibiotics are motilin receptor agonists. *Hepatogastroenterology*, **35**, 198 (1988)
21. Doherty W.L., Winter B.: Prokinetic agents in critical care. *Crit. Care*, **7**, 206–208 (2003)
22. Fox C., Dingman A., Derugin N., Wendland M.F., Manabat C., Ji S., Ferriero D.M., Vexler Z.S.: Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. **25**, 1138–1149 (2005)
23. Frossard J.L., Spahr L., Queneau P.E., Giostra E., Burckhardt B., Ory G., De Saussure P., Armenian B., De Peyer R., Hadengue A.: Erythromycin intravenous bolus infusion in acute upper gastrointestinal bleeding: a randomized, controlled, double blind trial. *Gastroenterology*, **123**, 17–23 (2002)
24. German-Fattal M.: Fusafungine, an antimicrobial with anti-inflammatory properties in respiratory tract infections – review and recent advances in cellular and molecular activity. *Clin. Drug Investig*. **21**, 653–670 (2001)
25. Goh K.P.: Management of hyponatremia. *Am. Fam. Physician*, **69**, 2387–2394 (2004)
26. Golub L.M., Goodson J.M., Lee H.M., Vidal A.M., McNamara T.F., Ramamurthy N.S.: Tetracyclines Inhibit Tissue Collagenases: Effects of Ingested Low-Dose and Local Delivery Systems. *J. Periodontol*. **56**, 93–97 (1985)
27. Golub L.M., Lee H.M., Ryan M.E., Giannobile W.V., Payne J., Sorsa T.: Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv. Dent. Res*. **12**, 12–26 (1998)
28. Golub L.M., McNamara T.F., Ryan M.E., Kohut B., Blieden T., Payonk G., Sipos T., Baron H.J.: Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol*. **28**, 146–156 (2001)
29. Gu Y., Lee H.M., Sorsa T., Simon S.R., Golub L.M.: Doxycycline inhibits mononuclear cell-mediated connective tissue breakdown. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. **58**, 218–225 (2010)
30. Hahn D.L., Grasmick M., Hetzel S., Yale S.: Azithromycin for bronchial asthma in adults: an effectiveness trial. *J. Am. Board Fam. Med*. **25**, 442–459 (2012)
31. Hahn D.L., Plane M.B., Mahdi O.S., Byrne G.I.: Secondary Outcomes of a Pilot Randomized Trial of Azithromycin Treatment for Asthma. *PLoS Clin. Trials*, **2**, e11, (2006)
32. Hatipoglu U., Rubinstein I.: Low-dose, long-term macrolide therapy in asthma: An overview. *Clin. Mol. Allergy*, **2**, 4 (2004)
33. Hu Y.Y., Xu J., Zhang M., Wang D., Li L., Li W.B.: Ceftriaxone modulates uptake activity of glial glutamate transporter-1 against global brain ischemia in rats. *J. Neurochem*. **132**, 194–205 (2015)
34. Itoh Z., Nakaya M., Suzuki T., Arai H., Wakabayashi K.: Erythromycin mimics exogenous motilin in gastrointestinal contractile activity in the dog. *Am. J. Physiol*. **247**, G688–694 (1984)
35. Jalal F.Y., Yang Y., Thompson J.F., Roitbak T., Rosenberg G.A.: Hypoxia-induced neuroinflammatory white-matter injury redu-

ced by minocycline in SHR/SP. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. **35**, 1145–1153 (2015)
36. Janssens J., Vantrappen G., Annese V., Peeters T.L., Tijskens G., Rekoumis G.: Effect of erythromycin on LES function and oesophageal body contractility. *Gastroenterology*, **98**, A64 (1990)
37. Jesionowska A., Cecerska-Heryć E., Marczuk N., Safronow K., Dołęgowska B.: Kwas lizofosfatydowy w nowotworach złośliwych. *Postępy Biochemii*, **4**, 381–387 (2015)
38. Jiang Z.D., Ke S., DuPont H.L.: Rifaximin-induced alteration of virulence of diarrhea-producing *Escherichia coli* and *Shigella sonnei*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35**, 278–281 (2010)
39. John R., Brazier J.S.: Antimicrobial susceptibility of polymerase chain reaction ribotypes of *Clostridium difficile* commonly isolated from symptomatic hospital patients in the UK. *J. Hosp. Infect*. **61**, 11–14 (2005)
40. Johnston S.L., Chauhan A. i wsp.: Azithromycin for Acute Exacerbations of Asthma: The AZALEA Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern. Med*. 176, 1630–1637 (2016)
41. Kajander K., Myllyluoma E., Kyrönpalo S., Rasmussen M., Sipponen P., Mattila I., Seppänen-Laakso T., Vapaatalo H., Oresic M., Korpela R.: Elevated pro-inflammatory and lipotoxic mucosal lipids characterise irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol*. **15**, 6068–6074 (2009)
42. Kalambokis G.N., Mouzaki A., Rodi M., Pappas K., Fotopoulos A., Xourgia X., Tsianos E.V.: Rifaximin improves systemic hemodynamics and renal function in patients with alcohol-related cirrhosis and ascites. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. **10**, 815–818 (2012)
43. Kew K.M., Undela K., Kotortsi I., Ferrara G.: Macrolides for chronic asthma. *Cochrane Database Syst. Rev*. **9**, CD002997 (2015)
44. Kliewer S.A., Goodwin B., Willson T.M.: The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr. Rev*. **23**, 687–702 (2002)
45. Krzyżanowska W., Pomierzy B., Budziszewska B., Filip M., Pera J.: N-Acetylcysteine and Ceftriaxone as Preconditioning Strategies in Focal Brain Ischemia: Influence on Glutamate Transporters Expression. *Neurotox. Res*. **29**, 539–550 (2016)
46. Ksiądzyna D.: Zaburzenia czynnościowe żołądka i dwunastnicy (w) Zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego, red. L. Paradowski, Cornetis, Wrocław, 2012, s. 89–104
47. Ksiądzyna D.: Wpływ innych chorób na czynność przewodu pokarmowego – gastropareza (w) Zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego, red. L. Paradowski, Cornetis, Wrocław, 2012, s. 213–227
48. Lee G.J., Lim J.J., Hyun S.: Minocycline treatment increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in Drosophila via FOXO. *Oncotarget*, **50**, 87878–87890 (2017)
49. Lee S.G., Su Z.Z., Emdad L., Gupta P., Sarkar D., Borjabad A., Volsky D.J., Fisher P.B.: Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J. Biol. Chem*. **283**, 13116–13123 (2008)
50. Lehtola J., Jauhonen P., Kesaniemi A., Wikberg R., Gordin A.: Effect of erythromycin on the oro-caecal transit time in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. **39**, 555–558, (1990)
51. Leung T.C.H., Lui C.N.P., Chen L.W., Yung W.H., Chan Y.S., Yung K.K.L.: Ceftriaxone ameliorates motor deficits and protects dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *ACS Chem. Neurosci*. **3**, 22–30 (2012)
52. Leung W.K., Chan F.K.L., Fung S.S.L., Wong M.Y., Sung J.J.Y.: Effect of oral erythromycin on gastric and small bowel transit time of capsule endoscopy. *World J. Gastroenterol*. **11**, 4865–4868 (2005)
53. Lewerenz J., Albrecht P., Tien M.L., Henke N., Karumbayaram S., Kornblum H.I., Wiedau-Pazos M., Schubert D., Maher P., Methner A.: Induction of Nrf2 and xCT are involved in the action of the neuroprotective antibiotic ceftriaxone in vitro. *J. Neurochem*. **111**, 332–243 (2009)
54. Liebregts T., Holtman G. i wsp.: Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **132**, 913–920 (2007)
55. Lund V.J., Grouin J.M., Eccles R., Bouter C., Chabolle F.: Efficacy of fusafungine in acute rhinopharyngitis: a pooled analysis. *Rhinology*, **42**, 207–212 (2004)
56. Marek T., Baniukiewicz A., Wallner G., Rydzewska G., Dąbrowski A.: Wytyczne postępowania w krwawieniu z górnego odcinka przewodu pokarmowego pochodzenia nieżylakowego. *Prz. Gastroenterol*. **3**, 1–22 (2008)
57. Matsumoto T., Uchiumi T., Monji K., Yagi M., Setoyama D., Amamoto R., Matsushima Y., Shiota M., Eto M., Kang D.: Doxycycline induces apoptosis via ER stress selectively to cells with a cancer stem cell-like properties: importance of stem cell plasticity. *Oncogenesis*, **11**, 397 (2017)
58. McGuire J.M., Bunch R.L., Anderson R.C., Boaz H.E., Flynn E.H., Powell H.M., Smith J.W.: „Ilotycin", a new antibiotic. *Antibiot. Chemother*. **2**, 281 (1952)
59. Menzel M., Akbarshahi H., Tufvesson E., Persson C., Bjermer L., Uller L.: Azithromycin augments rhinovirus-induced IFNβ via cytosolic MDA5 in experimental models of asthma exacerbation. *Oncotarget*, **19**, 31601–31611 (2017)
60. Mertens V., Blondeau K., Pauwels A., Farre R., Vanaudenaerde B., Vos R., Verleden G., Van Raemdonck D.E., Dupont L.J., Sifrim D.: Azithromycin reduces gastroesophageal reflux and aspiration in lung transplant recipients. *Dig. Dis. Sci*. **54**, 972–979 (2009)
61. Miell J., Dhanjal P., Jamookeeah C.: Evidence for the use of demeclocycline in the treatment of hyponatraemia secondary to SIADH: a systematic review. *Int. J. Clin. Pract*. **69**, 1396–1417 (2015)
62. Min Y., Li F. i wsp.: Minocycline-Suppression of Early Peripheral Inflammation Reduces Hypoxia-Induced Neonatal Brain Injury. *Front. Neurosci*. **11**, 511 (2017)
63. Moini-Zanjani T., Ostad S.N., Labibi F., Ameli H., Mosaffa N., Sabetkasaei M.: Minocycline Effects on IL-6 Concentration in Macrophage and Microglial Cells in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Iran. Biomed. J*. **20**, 273–279 (2016)
64. Mullany P., Wilks M., Tabaqchali S.: Transfer of macrolide-lincosamide – streptogramin B (MLS) resistance in *Clostridium difficile* is linked to a gene homologous with toxin A and is mediated by a conjugative transposon Tn5398. *J. Antimicrob. Chemother*. **35**, 305–315 (1995)
65. Peeters T., Matthijs G., Depoortere I., Cachet T., Hoogmartens J., Vantrappen G.: Erythromycin is a motilin receptor agonist. *Am. J. Physiol*. **257**, G470–G474 (1989)
66. Peiris-Pagès M., Sotgia F., Lisanti M.P.: Doxycycline and therapeutic targeting of the DNA damage response in cancer cells: old drug, new purpose. *Oncoscience*, **8**, 696–699 (2015)
67. Pietrzak A., Bartnik W., Szczepkowski M., Krokowicz P., Dziki A., Reguła J., Wallner G.: Polish interdisciplinary consensus on diagnostics and treatment of colonic diverticulosis. *Pol. Przeg. Chir*. **87**, 203–220 (2015)
68. Pilot M.A., Ritchie H.D., Thompson H., Zara G.P.: Alterations in gastrointestinal motility associated with erythromycin. *Br. J. Pharmacol*. **81**: 168P (1984)
69. Pimentel M., Forbes W.P. i wsp.: Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N. Engl. J. Med*. **364**, 22–32 (2011)
70. Pimentel M.: Review article: potential mechanisms of action of rifaximin in the management of irritable bowel syndrome with diarrhoea. *Aliment. Pharmacol. Ther*. **43** Suppl. 1, 37–49 (2016)

71. Pimentel M., Cash B.D., Limbo A., Wolf R.A., Israel R.J., Schoenfeld P.: Repeat rifaximin for irritable bowel syndrome: no clinical significant changes in stool microbial antibiotic sensitivity. *Dig. Dis. Sci*. **62**, 2455–2463 (2017)
72. Qin Y., Zhou H.G. i wsp.: Doxycycline reverses epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses the proliferation and metastasis of lung cancer cells. *Oncotarget*, **38**, 40667–40679 (2015)
73. Reiter J., Demirel N., Mendy A., Gasana J., Vieira E.R., Colin A.A., Quizon A., Forno E.: Macrolides for the long-term management of asthma – a meta-analysis of randomized clinical trials. *Allergy*, **68**, 1040–1049 (2013)
74. Richards R.D., Davenport K.G., Hurm K.D., Wimbish W.R., McCallum R.W.: Acute and chronic treatment of gastroparesis with erythromycin. *Gastroenterology*, **98**, A385 (1990)
75. Rifkin B.R., Vernillo A.T., Golub L.M.: Blocking Periodontal Disease Progression by Inhibiting Tissue-Destructive Enzymes: A Potential Therapeutic Role for Tetracyclines and Their Chemically-Modified Analogs. *Journal of Periodontology*, **64**, 819–827 (1993)
76. Rohof W.O., Bennink R.J., Ruigh A.A., Hirsch D.P., Zwinderman A.H., Boeckxstaens G.E.: Effect of azithromycin on acid reflux, hiatus hernia and proximal acid pocket in the postprandial period. *Gut*, **61**, 1670–1677 (2012)
77. Rothstein J.D., Fisher P.B. i wsp.: Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, **7021**, 73–77 (2005)
78. Ruzza P., Sechi G. i wsp.: Ceftriaxone blocks the polymerization of α-synuclein and exerts neuroprotective effects in vitro. *ACS Chem. Neurosci*. **5**, 30–38 (2014)
79. Sarna S.K., Lee M.B. i wsp.: Effects of erythromycin on human gastrointestinal motor activity in the fed and fasted states. *Gastroenterology*, **96**, A440 (1989)
80. Scholz R., Sobotka M., Caramoy A., Stempfl A., Moehle C., Langmann T.: Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *J. Neuroinflammation*, **12**: 209 (2015)
81. Secko D.: Antibiotics that protect the brain. *CMAJ* **172**, 467–468 (2005)
82. Sherlock M., Thompson C.J.: The syndrome of inappropriate antidiuretic hormone: current and future management options. *Eur. J. Endocrinol*. **162** Suppl. 1, S13–88 (2010)
83. Shlopov B.V., Stuart J.M., Gumanovskaya M.L., Hasty K.A.: Regulation of cartilage collagenase by doxycycline. *J. Rheumatol*. **28**, 835–842 (2001)
84. Smith G.N. Jr., Yu L.P. Jr., Brandt K.D., Capello W.N.: Oral administration of doxycycline reduces collagenase and gelatinase activities in extracts of human osteoarthritic cartilage. *J. Rheumatol*. **25**, 532–535 (1998)
85. Sorsa T., Tervahartiala T., Leppilahti J., Hernandez M., Gamonal J., Tuomainen A.M., Lauhio A., Pussinen P.J., Mäntylä P.: Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines. *Pharmacol. Res*. **63**, 108–113 (2011)
86. Spasovski G., Nagler E. i wsp.: Clinical practice guidelines on diagnosis and treatment of hyponatremia. *Eur. J. Endocrinol*. **170**, G1–47 (2014)
87. Stallinger S., Eller N., Högenauer C.: Non-interventional study evaluating efficacy and tolerability of rifaximin for treatment of uncomplicated diverticular disease. *Wiener Klin. Wochenschr*. **126**, 9–14 (2014)
88. Sturm A., Holtmann G., Goebell H., Gerken G.: Prokinetics in patients with gastroparesis: a systematic analysis. *Digestion*, **60**, 422–427 (1999)
89. Sy-Cordero A.A., Pearce C.J., Oberlies N.H.: Revisiting the enniatins: a revive of their isolation, biosynthesis, structure determination, and biological activities. *J. Antibiot*. **65**, 541–549 (2012)
90. Talley N.J., Verlinden M., Geenen D.J., Hogan R.B., Riff D., McCallum R.W., Mack R.J.: Effects of a motilin receptor agonist (ABT-229) on upper gastrointestinal symptoms in type 1 diabetes mellitus: a randomized, double blind, placebo controlled trial. *Gut*, **49**, 395–401 (2001)
91. Tang X., Wang X., Zhao Y.Y., Curtis J.M., Brindley D.N.: Doxycycline attenuates breast cancer related inflammation by decreasing plasma lysophosphatidate concentrations and inhibiting NF-κB activation. *Mol. Cancer*, **16**, 36 (2017)
92. Vezina C., Kudelski A., Sehgal S.N.: Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot*. **28**, 721–726 (1975)
93. Wang Z., Nong J., Shultz R.B., Zhang Z., Kim T., Tom V.J., Ponnappan R.K., Zhong Y.: Local delivery of minocycline from metal ion-assisted self-assembled complexes promotes neuroprotection and functional recovery after spinal cord injury. *Biomaterials*, **112**, 62–71 (2017)
94. Warny M., Pepin J., Fang A., Killgore G., Thompson A., Brazier J., Frost E., McDonald L.C.: Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*, **366**, 1079–1084 (2005)
95. Webley W.C., Hahn D.L.: Infection-mediated asthma: etiology, mechanisms and treatment options, with focus on *Chlamydia pneumoniae* and macrolides. *Respiratory Res*. **18**, 98 (2017)
96. Xu X., Gaggar A. i wsp.: Doxycycline improves clinical outcomes during cystic fibrosis exacerbations. *Eur. Respir. J*. **49**, pii: 1601102 (2017)
97. Zatmann T.F., Hall J.E., Harmer M.: Gastric residual volume in children: a study comparing efficiency of erythromycin and metoclopramide as prokinetic agents. *Br. J. Anaesth*. **86**, 869–871 (2001)
98. Zhang L., Xu L., Zhang F., Vlashi E.: Doxycycline inhibits the cancer stem cell phenotype and epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Cell Cycle*, **16**, 737–745 (2017)
99. Zhong W., Yang C. i wsp.: Doxycycline inhibits breast cancer EMT and metastasis through PAR-1/NF-κB/miR-17/E-cadherin pathway. *Oncotarget*, **62**, 104855-104866 (2017)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 313–328
http://www.pm.microbiology.pl

SZCZEPIONKI PRZECIW ZAKAŻENIOM ROTAWIRUSOWYM

Marta Prygiel, Klaudia Brodzik, Aldona Wiatrzyk, Małgorzata Główka, Katarzyna Woźnica, Karol Wdowiak, Urszula Czajka, Aleksandra A. Zasada*

Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Wpłynęło w maju, zaakceptowano we wrześniu 2018 r.

Streszczenie: Zakażenia rotawirusowe są najczęstszą przyczyną ostrych biegunek u dzieci poniżej 5 roku życia. Przed wprowadzeniem szczepień przeciwko rotawirusom na świecie dochodziło rocznie do 100–150 mln zachorowań, z czego około 500 tys. kończyło się zgonem. Pierwsze szczepionki przeciw infekcjom rotawirusowym powstały w latach 80. XX wieku. Natomiast w 2007 r. w Europie zostały zarejestrowane dwie doustne szczepionki zawierające żywe atenuowane szczepy rotawirusów: monowalentna szczepionka Rotarix (RV1) i pentawalentna szczepionka Rotateq (RV5). Szczepionki te są dostępne na całym świecie.

Po wprowadzeniu szczepień przeciw rotawirusom liczba zakażeń znacząco się zmniejszyła, a liczba zgonów dzieci z powodu tych zakażeń spadła o ponad połowę. Pomimo potwierdzonego bezpieczeństwa i skuteczności dostępnych szczepionek wciąż pojawiają się obawy związane z ich stosowaniem, które wynikają m.in. ze „złej sławy" szczepionek opracowywanych przed laty (wycofanych lub w ogóle nie wprowadzonych na rynek), które wiązały się z występowaniem niepożądanych odczynów poszczepiennych oraz stosunkowo niską skutecznością.

1. Charakterystyka molekularna rotawirusów. 2. Patogeneza zakażeń rotawirusowych. 3. Badania nad szczepionkami przeciw rotawirusom. 4. Epidemiologia zakażeń rotawirusowych. 5. Odporność zbiorowiskowa. 6. Obawy wobec stosowania szczepionek przeciw zakażeniom rotawirusowym. 7. Podsumowanie

VACCINES AGAINST ROTAVIRUS INFECTION

Abstract: Rotavirus infections are a leading cause of severe gastroenteritis in children under five years of age. Before the introduction of vaccination for rotavirus,100–150 million cases of infections were recorded globally, resulting in 500 000 deaths. The first rotavirus vaccines were designed in the 1980s. In 2007, two oral rotavirus vaccines containing live attenuated strains were registered in Europe: the monovalent vaccine Rotarix (RV1) and the pentavalent vaccine Rotateq (RV5). The vaccines are available all over the world.

After the introduction of rotavirus vaccination, the number of infections decreased significantly and the number of deaths due to rotavirus gastroenteritis in children decreased over 50% globally. However, despite confirmed safety and effectiveness of the RV1 and RV5 vaccines, fear of vaccination against rotavirus infection still exists. It can be related to the bad reputation of the previous rotavirus vaccines, which were withdrawn from the market or were never introduced to the market due to unsatisfying clinical tests.

1. Molecular chracteristic of rotaviruses. 2. Pathogenesis of rotavirus infection. 3. Studies on rotavirus vaccines. 4. Epidemiology of rotavirus infection. 5. Herd immunity. 6. Fear of vaccination against rotavirus infection 7. Summary

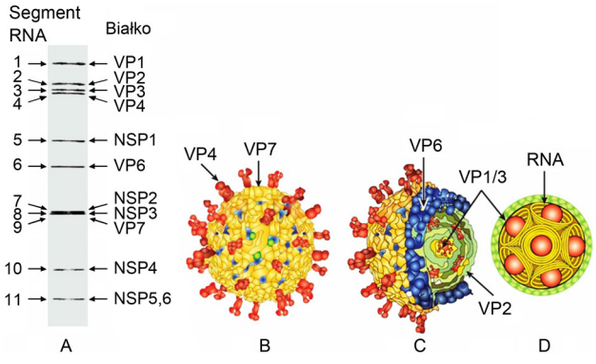
Słowa kluczowe: rotawirusy, szczepionki, zapalenie żołądka i jelit
Key words: rotavirus, vaccines, gastroenteritis

1. Charakterystyka molekularna rotawirusów

Rotawirusy należą do rodziny *Reoviridae*. Rodzina *Reoviridae* podzielona jest na dziewięć rodzajów, z których cztery (*Orthoreovirus*, *Coltivirus*, *Rotavirus* i *Orbivirus*) mogą infekować zarówno ludzi, jak i zwierzęta. Pięć pozostałych rodzajów powoduje zakażenia roślin (*Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*), owadów (*Cypovirus*) i ryb (*Aquareovirus*). Wiriony rotawirusów mają średnicę około 70–80 nm i posiadają trójwarstwowy ikosahedralny kapsyd białkowy otaczający genom wirusa, ale nie posiadają otoczki lipidowej. Warstwę zewnętrzną kapsydu buduje białko VP7, tworzące gładką powierzchnię, oraz białko VP4 (wirusowa hemaglutynina) wystające z powierzchni kapsydu i decydujące o przyłączaniu wirionu do infekowanej komórki. VP4 jest przecinane przez trypsynę na dwie podjednostki: VP8 i VP5. Cięcie to warunkuje wniknięcie wirusa do komórki nabłonkowej jelita. Na powierzchni białka VP4 występują epitopy dla przeciwciał neutralizujących wirus. Powierzchniowe białko kapsydu VP7 stanowi ok. 90% powierzchni wirionu i jest głównym antygenem. Warstwa środkowa kapsydu zbudowana jest z białka VP6, a warstwa wewnętrzna z białka VP2, do której przyłączone są dwa białka enzymatyczne VP1 i VP3 [21, 33]. Schemat budowy rotawirusa przedstawia Ryc 1.

Genom rotawirusów stanowi dwuniciowe RNA (dsRNA) podzielone na 11 segmentów, z których każdy ma wielkość ok. 680 par zasad. Kodują one sześć wymienionych wyżej białek strukturalnych (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 i VP7) oraz sześć białek niestrukturalnych oznaczonych kolejno NSP1-NSP6, które mają udział w replikacji genomu i ochronie przed naturalną

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



Ryc. 1. Schemat budowy genomu i wirionu rotawirusa

(A) Rozkład na żelu PAGE 11 segmentów dsRNA, składających się na genom rotawirusa. Po lewej stronie ponumerowano segmenty genowe, po prawej stronie wskazano kodowane przez nie białka. (B) Budowa kapsydu rotawirusa. Warstwa zewnętrza kapsydu zbudowana z białka VP7 jest koloru żółtego, natomiast wypustki białka VP4 są zabarwione na pomarańczowo. (C) Przekrój budowy wirionu rotawirusa pokazujący wewnętrzne warstwy zbudowane z białka VP6 (niebieskie) i białka VP2 (zielone) oraz enzymy transkrypcyjne zakotwiczone w warstwie VP2 (czerwone). (D) Schemat organizacji genomu rotawirusa. Wewnątrz warstwy zbudowanej z białka VP2 (zielone) upakowane są segmenty genomu przedstawione jako spiralne stożki otoczone enzymami transkrypcyjnymi (czerwone) (źródło*: Jayaram H., Estes M.K., Venkataram Prasad B.V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. Virus Research, 2004, 101: 67–8).

odpowiedzią immunologiczną oraz obejmują wirusową enterotoksynę NSP4 [21].

Rodzaj *Rotavirus* podzielony jest na 7 serogrup oznaczonych kolejnymi literami od A do G, z których tylko A, B, C i G, wywołują zakażenia u ludzi, przy czym serogrupa A odpowiedzialna jest za większość zakażeń i jest najczęściej opisywana jako czynnik etiologiczny biegunek. Serogrupa G wywołuje zakażenia także u zwierząt, natomiast serogrupy D-F jedynie u zwierząt [33]. Określenie antygenowości białka VP6 pozwoliło na wyodrębnienie w grupie antygenowej A, 4 podgrup: I, II, I+II, nie I nie II [49]. Serogrupa A rotawirusów została dalej podzielona na serotypy/genotypy w oparciu o białka VP4 i VP7. Klasyfikacja ta jest zapisywana w sposób, gdzie G oznacza białko VP7 (glikoproteina), a P oznacza białko VP4 (protease-sensitive protein). Dotychczas zidentyfikowano 15 G-sero/genotypów oraz 11 P-serotypów i 28 P-genotypów u ludzi i zwierząt [33]. Ze względu na to, że rotawirusy mają segmentowany genom, w przypadku mieszanych zakażeń może wystąpić proces reasortacji genów, co jest przyczyną zmienności antygenowej rotawirusów [52].

Cała rodzina *Reoviridae* wykazuje dużą stabilność w środowisku zewnętrznym. Wirusy należące do tej rodziny są niezwykle stabilne pod względem temperatury (mogą przetrwać w temperaturze –20°C, natomiast temperatura 60°C niszczy je dopiero po 30 minutach), zakresu pH 3,0–9,0 i rozpuszczalników lipidowych, ale są inaktywowane przez 95% etanol, fenol i chlor. Mogą przetrwać około 1 miesiąca w temperaturze pokojowej. Zakaźność rotawirusów wzrasta na skutek działania enzymów proteolitycznych, takich jak elastaza, trypsyna, pankreatyna [26].

2. Patogeneza zakażeń rotawirusowych

Do zakażenia rotawirusami dochodzi zazwyczaj drogą fekalno-oralną poprzez spożycie żywności lub wody zanieczyszczonej kałem osoby chorej, a także drogą oddechową przez wdychanie cząstek wirusa unoszących się w powietrzu powstałych np. z wymiocin chorego. Możliwe jest również zakażenie przez kontakt z osobą zakażoną, zanieczyszczone przedmioty (klamki, kurki kranów, deski sedesowe, zabawki, itp.) i brudne ręce [33]. Rotawirusy są wydalane w kale w wysokim stężeniu (do 10^{12} cząstek wirusowych na gram kału) nawet do 3 tygodni, począwszy od okresu przed wystąpieniem objawów, w okresie objawowym i po ustąpieniu objawów biegunki. Natomiast dawka zakaźna jest bardzo mała, określona na 10–100 cząstek wirusowych [33, 39].

Okres inkubacji zakażeń rotawirusowych wynosi od 2 do 4 dni, chociaż niektóre źródła szacują go na <48 godzin. Wirusy namnażają się w enterocytach jelita cienkiego i niszczą lub uszkadzają mikrokosmki jelita, w konsekwencji czego dochodzi do nieprawidłowości we wchłanianiu pokarmu. Obserwuje się zapalenie żołądka i jelit [26].

Rotawirusy wiążą się do receptorów na powierzchni komórek gospodarza za pośrednictwem powierzchniowego białka VP4. Receptorami dla szczepów rotawirusów ludzkich są tkankowe antygeny grup krwi (HBGAs – Histo-Blood Group Antigens), integryny, białko szoku cieplnego HSP70 oraz białka połączeń, takie jak łącząca cząsteczka adhezyjna A, okludyna, białko połączeń ścisłych ZO-1. Po wstępnym związaniu rotawirusa z komórką białka VP7 i VP5 oddziałują z receptorami powodując lokalne ich nagromadzenie w błonie i pośredniczenie we wniknięciu wirusa do komórki. Internalizacja wirusa do komórki zachodzi, w zależności od szczepu rotawirusa, na drodze endocytozy klatrynozależnej lub klatrynoniezależnej. Niski poziom jonów wapnia w utworzonym endosomie uruchamia usunięcie zewnętrznej warstwy kapsydu i uwolnienie do cytoplazmy aktywnej transkrypcyjnie cząstki z dwuwarstwowym kapsydem (DLP – Double-Layered Particle). W cytoplazmie następuje translacja wirusowego mRNA oraz replikacja wirusowego genomu, który następnie jest pakowany w nowe struktury DLP. Do utworzenia cząstki wirusowej z trójwarstwowym kapsydem konieczne jest związanie DLP z białkiem NSP4 oraz wpączkowanie do retikulum ednoplazmatycznego.

* Uzyskano zgodę Autorów na wykorzystanie ryciny w niniejszej pracy.

W retikulum endolazmatycznym tworzy się przejściowa otoczka i dodawane są białka VP4 i VP7 do struktury DLP. Następnie otoczka jest tracona i potomne wirusy zostają uwolnione z komórki poprzez jej lizę lub przez nietypowy mechanizm transportu pęcherzykowego zależny do aparatu Golgiego w polaryzowanych komórkach nabłonkowych. Uwalniane potomne cząstki wirusa zakażają kolejne części jelita cienkiego, po czym wydalane są do kału [21, 26].

Zakażenie indukuje odpowiedź limfocytów T CD4 i CD8. W zwalczaniu zakażenia uczestniczy odpowiedź komórkowa i humoralna. Po przebyciu zakażenia powstają przeciwciała surowicze IgM, IgG i wydzielnicze IgA skierowane przeciwko białkom wirusowym VP4 i VP7. Przeciwciała wydzielnicze klasy IgA stanowią ochronę przed zachorowaniem po ponownym kontakcie z rotawirusem. Immunoglobuliny surowicze nie pełnią roli ochronnej, a jedynie potwierdzają przebycie zakażenia [26, 52, 76].

W wyniku zapalenia mikrokosmków, będącego wynikiem infekcji rotawirusowej, dochodzi do upośledzenia produkcji enzymów trawiennych uczestniczących w procesach metabolicznych. Niedobór lub brak tych enzymów skutkuje zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej. Dochodzi do odwodnienia izotonicznego, niekiedy z towarzyszącą kwasicą metaboliczną. Znaczny niedobór wody w ustroju może doprowadzić do poważnych powikłań, do których należy odwodnienie hipertoniczne. Doświadcza go 5% chorych, z czego ¼ przypadków wymaga hospitalizacji na oddziale intensywnej opieki medycznej. W wyniku redukcji wchłaniania sodu i glukozy może wystąpić biegunka osmotyczna. U 20% pacjentów pojawiają się drgawki gorączkowe spowodowane hipoglikemią lub zaburzeniami elektrolitowymi w przebiegu ciężkiej biegunki oraz będące konsekwencją penetracji wirusa do ośrodkowego układu nerwowego. Obserwowano przypadki zapalenia mózgu i podrażnienia opon mózgowo-rdzeniowych. Z kolei niestrukturalne białko wirusa posiadające właściwości enterotoksyny (NSP4) doprowadza do zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia i wystąpienia biegunki wydzielniczej [26, 61].

Stan chorobowy wywołany rotawirusami trwa zazwyczaj od 4 do 10 dni. Może przyjąć formę bezobjawową, ale najczęściej przebiega z gorączką, bólami brzucha, wymiotami i wodnistą biegunką. Dolegliwościom tym czasem towarzyszą dysfunkcje górnych dróg oddechowych i osłabienie. Zwykle objawy choroby ustępują samoistnie, ale silne odwodnienie może doprowadzić do śmierci. Choroba jest szczególnie niebezpieczna dla dzieci < 5 roku życia [33, 52]. Zazwyczaj pierwsze zakażenie przebiega najciężej, jednak niemowlęta w pierwszych trzech miesiącach życia często przechodzą zakażenie bezobjawowo. Wynika to z obecności przeciwciał matczynych uzyskanych przez dziecko w wieku płodowym, bądź przyjmowanych z mlekiem matki. Dodatkowo w przewodzie pokarmowym niemowląt aktywność proteaz powierzchniowych obecnych na komórkach wyścielających światło jelita jest mniejsza niż u dorosłych, dzięki czemu proces wnikania wirusa do wnętrza komórki i wywołania stanu chorobowego jest utrudniony [25, 52].

3. Badania nad szczepionkami przeciw rotawirusom

Pierwsze szczepionki przeciwko rotawirusom powstały w latach 80. XX wieku, a ponieważ oparte były na wiedzy, że zarówno ludzkie jak i zwierzęce rotawirusy mają niektóre antygeny wspólne, były pochodzenia zwierzęcego [38]. Były to szczepionki monowalentne: zawierające cielęcy szczep rotawirusa szczepionki WC3 (Wistar Calf 3) oraz RIT 4237 oraz szczepionka RRV MMU 18006 zawierająca szczep rotawirusa pochodzący od małpy [79].

Szczepionka zawierająca bydlęcy szczep rotawirusa WC3 była szczepionką żywą, atenuowaną otrzymaną przez wielokrotne pasażowanie wirusa w hodowli komórkowej, zawierającą liofilizat wirusa w ilości 1×10^7 PFU. Badania skuteczności przeprowadzone we Francji na grupie 25 niemowląt w wieku 5–12 miesięcy (średni wiek 8,6 miesiąca) wykazały obecność przeciwciał neutralizujących swoistych dla szczepu WC3 u 88% zaszczepionych niemowląt. U odpowiednio 72% oraz 48% zaszczepionych dzieci zaobserwowano również odporność krzyżową na ludzkie rotawirusy SA11 oraz WA. Odpowiedź immunologiczna była podobna, niezależnie od tego, czy niemowlę miało przeciwciała przed immunizacją czy nie, ale zaobserwowano wzmocnienie odporności u dzieci, które miały przeciwciała przeciwko rotawirusowi przed immunizacją. Nie zgłaszano objawów biegunki u badanych niemowląt przez okres dwóch tygodni od immunizacji, wymioty o niewyjaśnionej etiologii zgłaszano raz, a gorączkę powyżej 37,8°C występującą w ciągu pierwszego tygodnia po szczepieniu zgłoszono 3 razy. Biorąc pod uwagę pierwsze obiecujące wyniki, planowano testy skuteczności w różnych częściach świata [34].

Kolejna opracowana w 1982 roku, eksperymentalna szczepionka zawierająca zdolny do replikacji bydlęcy szczep rotawirusa to RIT 4237. Badania prowadzone nad tą szczepionką były pierwszym wspólnym przedsięwzięciem krajów europejskich, mającym na celu zapobieganie ostrym biegunkom występującym u ludzi [31]. Badania szczepionki rozpoczęto w Finlandii, gdzie przeprowadzono trzy badania dotyczące bezpieczeństwa oraz immunogenności [82]. W pierwszym, niemowlętom w wieku 8–11 miesięcy podawano jedną dawkę szczepionki bezpośrednio przed sezonem epidemicznym

[80]. W drugim badaniu, dwie dawki szczepionki podawano niemowlętom w wieku 6–12 miesięcy, również przed wystąpieniem sezonu epidemicznego zakażeń rotawirusowych [81]. Trzecie badanie przeprowadzone zostało w latach 1984–1985 i obejmowało trzy grupy noworodków [83, 84]. W jednej grupie podawano pierwszą dawkę szczepionki tuż po urodzeniu, a drugą w wieku siedmiu miesięcy. W dwóch pozostałych grupach podawano pojedynczą dawkę szczepionki w piątej dobie życia. We wszystkich badaniach szczepionkę podawano jesienią, przed wystąpieniem sezonu epidemicznego. Skuteczność szczepionki w zapobieganiu wszystkim epizodom nieżytu żołądkowo-jelitowego wyniosła 43–62%, a w zapobieganiu zakażeń o ciężkim przebiegu 80–89%. Badania dotyczące skuteczności szczepionki rozpoczęto również w Austrii i Anglii, ale w 1986 roku, kiedy producent wycofał szczepionkę nie były one jeszcze zakończone [74].

Badania nad szczepionką zawierającą szczep rotavirusa pochodzący od małpy *Rhesus* (RRV) prowadzono w Europie w latach osiemdziesiątych. Zaobserwowano niedopuszczalnie dużą częstość wystąpienia niepożądanych odczynów poszczepiennych (NOP) (odsetek reakcji gorączkowych wynosił 79%) w stosunku do stosunkowo niskiej skuteczności wynoszącej zaledwie 48%. Uznano, że tak wysokie nasilenie NOP jest niedopuszczalne [36].

Kolejna generacja szczepionek oparta była na zastosowaniu w składzie szczepionki rotawirusowych reasortantów ludzko-zwierzęcych otrzymanych *in vitro*. W reasortantach dochodzi do ekspresji głównych antygenów białkowych kapsydu budujących cząsteczki rotawirusów występujących u ludzi na wirionach rotawirusów zwierzęcych. Pierwsze obiecujące doniesienia dotyczyły powstającej w Stanach Zjednoczonych szczepionki RRV-TV, która zawierała w swoim składzie reasortant rotawirusa pochodzący od małpy *Rhesus* i od człowieka. Była do szczepionka poliwalentna i zawierała w swoim składzie cztery najbardziej powszechne serotypy G rotawirusów G1, G2, G3 i G4: trzy z nich (G1, G2 oraz G4) będące reasortantami wirusów ludzko-małpich oraz szczep G3 rotawirusa małpy *Rhesus* [49]. Badania nad jej skutecznością i bezpieczeństwem przeprowadzone zostały na szeroką skalę i obejmowały różne kontynenty, w tym Europę, Ameryką Północną oraz Południową. Wykazały one wysoką skuteczność (80–100%) w zapobieganiu zakażeń o ostrym przebiegu [46, 68, 72]. Dlatego też 31 sierpnia 1998 roku Food and Drug Administration (FDA) w Stanach Zjednoczonych wydało pozwolenie na stosowanie szczepionki RRV-TV do rutynowego uodporniania niemowląt i małych dzieci. Szczepionka ta była rekomendowana przez Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) oraz American Academy of Pediatrics (AAP). Szczepionkę pod nazwą Rotashield produkowaną przez Wyeth Laboratories w Pensylwanii zaczęto podawać w USA dzieciom od 6 tygodnia do ukończenia 1 roku życia. Rejestracja szczepionki w Unii Europejskiej była już bliska, kiedy na przełomie 1998 i 1999 roku, po zaszczepieniu ponad 600 000 dzieci, u 15 szczepionych dzieci wystąpiło wgłobienie jelit, które miało poważne konsekwencje [11]. Choroba ta to patologiczne, teleskopowe wsuwanie jednej części jelita w drugą najczęściej w okolicy kątnicy, gdzie jelito cienkie wsuwa się w grube. Choroba może prowadzić do niedokrwienia jelita, a co za tym idzie skutkować interwencją chirurgiczną ratującą zdrowie i życie [1]. Chociaż wgłobienie jelit wystąpiło tylko u 15 dzieci potraktowano je jako niepożądany odczyn poszczepienny i zgłoszono do Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). Wszystkie objawy niepożądane wystąpiły między 3, a 10 dniem po podaniu pierwszej z trzech dawek szczepionki Rotashield. Pomimo trudności z oszacowaniem związku wystąpienia wgłobienia jelita z podaniem szczepionki, latem 1999 roku Center for Diesease Control (CDC) w Atlancie wycofało rekomendacje dla szczepionki Rotashield. Producent wycofał szczepionkę z amerykańskiego rynku 14 miesięcy po jej wprowadzeniu, a rozpoczęte w Azji i Afryce badania kliniczne zostały przerwane, mimo braku dowodów, że wgłobienie jelit spowodowane jest podaniem szczepionki [62].

Przedmiotem kolejnych badań stały się również szczepionki zawierające reasortanty szczepów ludzkich rotawirusów ze szczepem bydlęcym WC3 – szczepionki duwalentne (zawierające szczepy G1, G2) oraz czterowalentne (zawierające szczepy G1-G4). W badaniach przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych metodą podwójnie ślepej próby z placebo, wykazano ich dobry profil bezpieczeństwa i skuteczność [18, 19].

Następnie opracowano szczepionkę (RV5) zawierającą pięć żywych reasortantów ludzko-bydlęcych rotawirusa: G1, G2, G3, G4 niosące jako antygen biało VP7 kapsydu rotawirusów oraz szczep P1[8], który ma za zadanie wytworzenie przeciwciał przeciwko białku VP4 kapsydu rotawirusa. Szczepy szczepionkowe uzyskano przez zastąpienie jednego z genów rotawirusa cieląt WC3, kodującego białka powierzchniowe, odpowiednim genem z najczęstszych typów serologicznych rotawirusów człowieka, w procesie resegregacji genowej. Aby poszerzyć zakres ochronny szczepionki do jej składu dodano najpowszechniej występujący serotyp P ludzkiego rotawirusa (odpowiadający za występowanie około 90% wszystkich biegunek o etiologii rotawirusowej). Szczepionka została przebadana w 11 krajach z ośrodkiem badań w Stanach Zjednoczonych i Finlandii [78]. Badanie zostało przeprowadzone na grupie niemowląt w wieku 6–12 miesięcy, którym podawano 3 dawki szczepionki lub placebo. Ponieważ badanie rozwijało się dobrze i nie budziło żadnych obaw dotyczących bezpieczeń-

stwa szczepionki, włączono do niego inne kraje, jak Niemcy, Belgia, Szwecja. Pod koniec okresu rekrutacji w 2004 roku zaszczepiono około 70 000 dzieci, w tym 43% w Europie. W głównym okresie obserwacji, trwającym 42 dni po przyjęciu każdej z dawek szczepionki, nie wykazano zwiększonego ryzyka wystąpienia wgłobienia jelita u dzieci zaszczepionych w porównaniu do dzieci otrzymujących placebo. Łącznie w okresie obserwacji trwającym rok od podania pierwszej dawki stwierdzono 12 przypadków wgłobienia jelita u dzieci zaszczepionych oraz 15 przypadków w grupie pacjentów otrzymujących placebo [78, 33]. Szczepionka charakteryzuje się dobrym profilem bezpieczeństwa – nie zaobserwowano częstszego występowania gorączki i drażliwości u dzieci szczepionych w porównaniu do otrzymujących placebo. Dwa tygodnie po otrzymaniu trzeciej dawki szczepionki oznaczano poziom przeciwciał IgA swoistych wobec rotawirusów. Serokonwersja widoczna była w 95% badanych surowic. Skuteczność szczepionki została oceniona na 74% w zapobieganiu nieżytowi żołądkowo-jelitowemu i w 98% chroniła przed wystąpieniem ostrej postaci choroby. Ponadto oszacowano, że szczepionka zapobiegała 2,7 mln epizodom biegunek rotawirusowych, 70 tys. hospitalizacji oraz 400 tys. wizyt u lekarza rocznie [78]. Szczepionka ta pod nazwą RotaTeq® firmy Merck & Co Int., USA została zarejestrowana przez FDA w lutym 2006 roku jako dostępna do rutynowego uodporniania niemowląt w Stanach Zjednoczonych. Rekomendowany schemat szczepienia obejmuje trzy dawki szczepionki podawane w 2, 4 oraz 6 miesiącu życia. Pierwsza dawka powinna być podana między 6, a 12 tygodniem życia dziecka z zachowaniem 4–10-tygodniowego odstępu między kolejnymi dawkami. Ostatnia dawka szczepionki musi być podana przed ukończeniem 32 tygodnia życia niemowlęcia, a pierwsza dawka nie może być podana po ukończeniu 12 tygodnia życia dziecka. Dane dotyczące monitorowania niepożądanych odczynów poszczepiennych po zaszczepieniu 44 000 dzieci po rejestracji szczepionki nie wykazały związku przyczynowo skutkowego podania szczepionki z wystąpieniem ryzyka wgłobienia jelit, dlatego też w maju 2007 roku szczepionka RotaTeq została zarejestrowana w ponad 100 krajach Australii, Kanady, Unii Europejskiej, Azji i Ameryki Łacińskiej [12].

W literaturze można znaleźć również informacje o szczepionkach wprowadzonych w latach 90. zawierających rotawirusy pochodzące od ludzi. Jedną z nich była szczepionka 89–12 zawierająca wirus wyizolowany z kału noworodka i namnażany w komórkach nerki małpiej VERO. Szczepionka ta okazała się dobrze tolerowana i skuteczna (89% skuteczności w ochronie przeciw występowaniu nieżytowi żołądkowo-jelitowemu). Wiadomo jednak, iż nie została wprowadzana do czynnego uodporniania niemowląt i starszych dzieci, a szczep 89–12 został przekazany do laboratorium GlaxoSmithKline Biologicals (GSK), gdzie po wielokrotnym pasażowaniu oraz klonowaniu został udoskonalony i oznaczony symbolem RIX4414 [3]. Szczep RIX4414 jest to szczep P1A[8]G1 zawierający główne antygeny kapsydu rotawirusów VP7 oraz VP4. Jest on substancją czynną stosowanej obecnie na szeroką skalę szczepionki Rotarix® firmy GSK, Belgia. Jest to szczepionka monowalentna (RV1) i zawiera żywy, atenuowany szczep RIX4414 (G1P) ludzkiego rotawirusa, produkowany na linii komórek VERO. Wieloośrodkowe badania kliniczne mające ocenić bezpieczeństwo zostały przeprowadzone na grupie ponad 63 000 niemowląt w 11 krajach Ameryki Łacińskiej i Finlandii i potwierdziły brak związku wystąpienia wgłobienia jelita z podaniem szczepionki. Z tego obejmującego dużą populację badania wyłoniono grupę 20 169 niemowląt, na której przeprowadzono ocenę skuteczności szczepionki. Efektywność szczepionki w zapobieganiu nieżytowi żołądkowo-jelitowemu oceniono na 85% i na 100% w zapobieganiu ostrym objawom choroby [66]. W badaniu obejmującym 2155 dzieci prowadzonym w Meksyku, Wenezueli i Brazylii wykazano jej 70% skuteczność w zapobieganiu wszystkim epizodom nieżytu żołądkowo-jelitowego oraz 86% skuteczność w zapobieganiu ciężkiej postaci klinicznej choroby przebiegającej z odwodnieniem [83]. Szczepionkę pod nazwą Rotarix zarejestrowano po raz pierwszy w 2004 roku w Meksyku, a od maja 2007 stosowana jest w ponad 90 krajach na całym świecie, w tym w Europie. Rekomendowany schemat szczepienia obejmuje dwie dawki szczepionki rozpoczynając od 6 tygodnia życia dziecka. Szczepionka podawana jest doustnie w dwóch dawkach niemowlętom między 6, a 16 tygodniem życia, 2 dawkę preparatu podaje się w odstępie od 4–8 tygodni, ale przed ukończeniem 24 tygodnia życia dziecka, ale najlepiej, aby schemat szczepienia został ukończony przed 16. tygodniem życia. Szczepionka może być podawana równolegle z innymi szczepionkami.

Od 2009 r. istnieją zalecenia Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) do włączania do krajowych programów szczepień ochronnych, szczepionek przeciwko rotawirusom stosowanych u niemowląt we wczesnym okresie życia tj. przed ekspozycją na pierwszą objawową naturalną infekcję, u których powikłania są zwykle najcięższe [81]. W 2013 roku w skali globalnej odnotowano około 215 000 zgonów u dzieci poniżej 5 roku życia, których czynnikiem sprawczym były rotawirusy. Większość z nich, bo 121 000, co stanowi 56%, wystąpiło w Afryce Subsaharyjskiej, a 47 100 (22%) miało miejsce w Indiach [75]. Dwie dostępne na całym świecie szczepionki Rotarix (RV1) i RotaTeq (RV5), wykazują wysoką skuteczność w zapobieganiu zakażeniom o ciężkim przebiegu w krajach uprzemysłowionych, ale ich efektywność jest znacznie niższa w krajach o wysokim

wskaźniku śmiertelności z powodu zakażeń wirusami Rota. Dla szczepionki Rotarix w badaniach przeprowadzonych w Południowej Afryce i Malawi skuteczność wyniosła 61% [57], a skuteczność dla szczepionki RotaTeq w badaniach przeprowadzonych w Ghanie, Keni, Mali, Bangladeszu i Wietnamie wyniosła 59% [8]. Niedawne badania przeprowadzone w Bangladeszu, wykazały zmniejszenie częstości występowania biegunki rotawirusowej o 33% u niemowląt, które otrzymały co najmniej jedną dawkę szczepionki Rotarix [86]. Na Filipinach, począwszy od 2012 r., w ciągu 3 lat od wprowadzenia szczepionki Rotarix, liczba hospitalizacji spowodowanych odwodnieniem w przebiegu zakażeń rotawirusowych u niemowląt znacznie się zmniejszyła [55]. Dlatego też, pomimo niższej ochrony zapewnianej przez Rotarix i RotaTeq w warunkach wysokiej śmiertelności dzieci, korzyści zdrowotne wynikające ze szczepienia są większe niż całkowite zaniechanie immunoprofilaktyki. Szczepionki przeciwko rotawirusom zostały wprowadzone już w krajach Ameryki Łacińskiej i zaczynają być stosowane w krajach Afryki Subsaharyjskiej oraz Azji Środkowej. Dzięki działalności organizacji wspierających szczepienia, opóźnienie to ulega skróceniu. W 2016 roku 82 kraje dodały szczepienie przeciw rotawirusom do krajowych programów szczepień ochronnych niemowląt [47]. W krajach o niskim dochodzie i dużym przyroście naturalnym (Indie, Chiny, Wietnam, Indonezja) zaczyna się wprowadzać szczepionki licencjonowane na rynki krajowe, ponieważ ze względu na wysokie koszty ograniczona jest globalna podaż dwóch szeroko stosowanych szczepionek rotawirusowych.

Jedyną zarejestrowaną szczepionką zawierającą w swoim składzie zwierzęcy rotawirus G10P [15] (pochodzący od owcy) jest monowalentna szczepionka LLR (Lanzhou Lamb Rotavirus vaccine). Jest to szczepionka zarejestrowana tylko w Chinach od 2000 roku i produkowana przez Lanzhou Instytut w Chinach. Szczepionka podawana jest dzieciom między 2 miesiącem, a 3 rokiem życia w schemacie trzydawkowym: pierwsza z dawek szczepionki podawana jest przed sezonem epidemicznym, a dwie kolejne w odstępach rocznych po sobie [45]. W latach 2008–2014 chińskim dzieciom podano 60 milionów dawek szczepionki LLR, pomimo braku potwierdzonej w badaniu klinicznym III fazy jej skuteczności. Ostatnie przeprowadzone badania skuteczności szczepionki u dzieci poniżej 5 lat wskazują na jej efektywność na poziomie 35% w zapobieganiu biegunce o umiarkowanym przebiegu, do skuteczności na poziomie 53% w zapobieganiu ciężkim zachorowaniom z powikłaniami [87].

Próby opracowania skutecznej szczepionki podjęto również w Indiach, gdzie podczas epidemii infekcji rotawirusowych panujących na tamtym terenie wyizolowano dwa naturalne reasortanty ludzko-bydlęce: szczep 116E oraz szczep I321. Oba szczepy zawierały w swoim genomie geny spotykane zarówno u rotawirusów bydlęcych jak i ludzkich i używane były do produkcji szczepionek, które miały być stosowane do czynnego uodporniania dzieci i niemowląt w Indiach. Niestety część prób ich wdrożenia objęła tylko badania przedkliniczne [22]. Natomiast szczep rotawirusa 116E jest substancją czynną szczepionki Rotavac zarejestrowanej od stycznia 2014 roku w Indiach.

Rotavac (Bharat Biotech International Limited) to monowalentna szczepionka zawierająca naturalnie występujący reasortant wirusa G9P[11], posiadający jeden gen rotawirusa bydlęcego P[11] i dziesięć genów ludzkiego rotawirusa. Duże wieloośrodkowe, podwójnie zaślepione, randomizowane badanie przeprowadzone w Delhi, Pune i Vellore wykazało, że szczepionka była dobrze tolerowana, ze skutecznością na poziomie 56% w zapobieganiu zakażeń o ciężkim przebiegu w pierwszym roku po szczepieniu [4]. Po otrzymaniu pozwolenia, rutynowe szczepienia za pomocą szczepionki Rotavac wprowadzono w czterech regionach Indii (Odisha, Andhra Pradesh, Haryana i Himachal Pradesh), planując rozszerzenie immunoprofilaktyki w całym kraju [2]. Producent szczepionki Rotavac, firma Bharat Biotech, stara się o wstępną kwalifikację szczepionki przez WHO, co sprawi, że produkt będzie kwalifikował się do zakupu przez Organizację Narodów Zjednoczonych, która silnie wspiera immunoprofilaktykę.

Narodowy Instytut Leków w Indiach dopuścił do stosowania na terenie Indii szczepionkę Rotasiil opracowaną przez Serum Institute of India Limited we współpracy z Amerykańskim Narodowym Instytutem Alergii i Chorób Zakaźnych. Jest to szczepionka żywa, atenuowana, zawierającą reasortanty ludzko-bydlęce o serotypach G1, G2, G3, G4 i G9. Rotasiil jest produktem liofilizowanym i zaopatrzonym w cytrynianowy bufor wodorowęglanowy, który dodaje się do rekonstytucji tuż przed podaniem doustnym. Szczepionka zachowuje stabilność w temperaturze 37°C przez dwa lata i przez sześć miesięcy w temperaturze 40°C. Podwójne zaślepione badanie kliniczne, z placebo przeprowadzone w Republice Nigru, w którym szczepionka została podana bez zachowania zimnego łańcucha chłodniczego, wykazało 67% skuteczność szczepionki w zapobieganiu ciężkiemu zapaleniu żołądka i jelit [43]. Szczepionka Rotasiil podobnie jak szczepionka Rotavac poddawana jest ocenie WHO, celem stosowania w ramach rozszerzonego programu szczepień ochronnych (The Expanded Programme on Immunization). Dodatkowo jako jedyna z obecnie stosowanych szczepionek może być dostarczona bez zachowania łańcucha chłodniczego, co może być ogromną zaletą w wielu ubogich rejonach, w których brakuje lodówek i zasilania elektrycznego [63].

Szczepionka rotawirusowa Rotavin-M1 jest produkowana przez Centrum Badań i Produkcji Szczepionek oraz Produktów Biologicznych w Wietnamie i została dopuszczona w 2012 roku do stosowania w tym kraju. Substancją czynną szczepionki jest atenuowany szczep G1P[8], wyizolowany od wietnamskiego dziecka. Wstępne badanie kliniczne wykazało, że szczepionka jest bezpieczna i immunogenna dla wietnamskich niemowląt [28]. Obecnie szczepionka dostępna jest tylko za opłatą i nie została włączona do kalendarza powszechnych szczepień ochronnych. Wkrótce mają rozpocząć się badania skuteczności szczepionki na szerszą skalę.

Wprowadzenie szczepionek przeciw rotawirusom ma znaczący wpływ na spadek zakażeń rotawirusowych na całym świecie, jednak ze względu na niewystarczającą skuteczność niektórych z nich, kilka potencjalnych szczepionek jest w przygotowaniu [11, 54], co przedstawiono w Tabeli I.

Jedną z nich jest szczepionka RV3-BB docelowo przeznaczona do podawania w momencie urodzenia. RV3 jest ludzkim szczepem rotawirusa, który jest związany z bezobjawową infekcją noworodkową i dobrze się replikuje w jelicie niemowlęcia. Jednoośrodkowe, randomizowane, podwójnie zaślepione badanie fazy I wykazało, że pojedyncza dawka szczepionki rotawirusowej RV3-BB była dobrze tolerowana przez dorosłych, dzieci i niemowlęta [27]. Badanie fazy II przeprowadzone na noworodkach z Nowej Zelandii wykazało, że szczepionka jest bezpieczna i dobrze tolerowana [5].

Zespół badaczy z Brazylii pracuje nad pentawalentną, żywą szczepionką zawierającą reasortnaty ludzko-bydlęce. Badanie kliniczne fazy 1 przeprowadzone na 79 dorosłych ochotnikach wykazało, że szczepionka jest bezpieczna i immunogenna [56].

W Indiach firma Sanofi Shantha Biotechnics pracuje nad szczepionką BRV-TV zawierającą w swoim składzie ludzko-bydlęce reasortanty rotawirusa obejmujące antygeny przeciwko czterem serotypom. Szczepionka składa się z trzech gotowych do podania doustnego dawek – pierwszej od 6. do 8. tygodnia życia, a kolejnych w 4-tygodniowych odstępach. Badanie fazy I wykazało, że szczepionka jest bezpieczna, dobrze tolerowana i immunogenna [32].

Tabela I
Szczepionki rotawirusowe w badaniach

Faza badania	Rodzaj szczepionki/ (nazwa)	Substancja czynna	Droga podania	Organizator badań
Badania wstępne	Podjednostkowa	BiałkoVP6 rotawirusa oraz puste cząstki (VLP) norowirusa GI i GII	Nieopracowana	Uniwersytet Medyczny w Tampere, Finlandia
Badania przedkliniczne	Podjednostkowa	Zmodyfikowane białko VP8 rotawirusa oraz puste cząstki (VLP) norowirusa	Nieopracowana	Szpital Dziecięcy w Cincinnati, USA
Badania przedkliniczne	Podjednostkowa	Puste cząstki (VLP) rotawirusa VP 2/6/7 oraz VP 2/4/6/7	Nieopracowana	Baylor College of Medicine, USA
Badania przedkliniczne	Inaktywowana	Inaktywowany szczep rotawirusa G1P[8] oraz G2P[4]	Domięśniowa lub śródskórna	USA Centers for Diseases Control and Prevention
Faza I badań klinicznych	Podjednostkowa (P2-VP8)	Rekombinowane białko VP8 kapsydu rotawirusa oraz epitop P2 tokysny tężcowej	Domięśniowa	Walter Reed Army Institute of Research (Silver Spring, MD, USA)
Faza I badań klinicznych	Żywa, atenuowana	Ludzko-bydlęce (UK) reasortanty rotawirusa	Doustna	Wuhan Institute of Biological Products, China and PATH, USA
Faza I badań klinicznych	Żywa, atenuowana	Ludzko-bydlęce (UK) reasortanty rotawirusa	Doustna	Instituto Butantan, Brazil
Faza II badań klinicznych	Podjednostkowa	Zmodyfikowane białko VP8 z serotypów P4, P6, P8 rotawirusa	Domięśniowa	National Institutes of Health and PATH, USA
Faza IIb badań klinicznych	Żywa, atenuowana (RV3-BB)	Ludzki szczep rotawirusa G3P[6]	Doustna	Murdoch Children's Research Institute, Australia and Biofarma, Indonesia
Faza III badań klinicznych	Żywa, atenuowana (BRV-TV)	Bydlęce szczepy rotawirusa G1-G4	Doustna	Shantha Biotech, India
Faza III badań klinicznych	Żywa, atenuowana	Ludzko-małpie reasortanty rotawirusa	Doustna	International Medica Foundation and PATH, USA
Faza III badań klinicznych	Żywa, atenuowana	Ludzko-owcze reasortanty rotawirusa	Doustna	Lanzhou Institute of Biological Products, China

Na podstawie Burnett i wsp. [10]

W Stanach Zjednoczonych opracowano pierwszą podawaną pozajelitowo, podjednostkową szczepionkę P2-VP8. Substancją czynną szczepionki jest rekombinowane białko VP8 kapsydu ludzkiego rotawirusa G1P[8] połączone z determinantą antygenową toksyny tężcowej wytwarzane w prokariotycznym systemie ekspresyjnym – komórkach bakterii *Echerichia coli*. Profil bezpieczeństwa szczepionki przebadany na zdrowych południowoafrykańskich dzieciach został uznany za odpowiedni, a immunogenność trzech dawek szczepionki okazała się wystarczająca w ochronie przeciwko chorobie wywołanej przez rotawirusy. Rozpoczęto badania kliniczne szczepionki o poszerzonym składzie – zawierającej dodatkowo rekombinowane białka strukturalne rotawirusów VP4 oraz VP6 [37, 65].

Wytwarzanie szczepionek nowej generacji oparte jest również o zastosowanie jako substancji czynnej szczepionki pustych cząstek wirusowych VLP nie zawierających kwasu nukleinowego, a jedynie białka kapsydu wirusów. Podobnie jak w przypadku szczepionek rekombinowanych jest ono strategią na wyeliminowanie ryzyka wgłobienia jelit oraz szansą na zwiększenie skuteczności szczepionki poprzez brak jej interakcji z mikroflorą jelit człowieka. Dodatkową zaletą może być nowa innowacyjna droga podania szczepionki – śródskórna lub domięśniowa, która pozwoli na skojarzenie jej z antygenami szczepionek używanych do rutynowego uodporniania niemowląt, a brak ryzyka wyplucia lub zwrócenia szczepionki z pokarmem przez niemowlę zwiększy jej skuteczność. Zastąpienie wirusów zdolnych do replikacji rekombinowanymi białkami kapsydu rotawirusów ma bezpośredni wpływ na zwiększenie stabilności termicznej szczepionki, co pośrednio wpływa na zmniejszenie kosztów dystrybucji oraz utylizacji szczepionki [10]. W fazie testów znajdują się również innowacyjne systemy do podawania inaktywowanych szczepionek rotawirusowych tzw. plastry z mikroiglicą (microneedle patch), które być może w przyszłości pozwolą na podawanie minimalnych dawek antygenów zapewniających odporność [59]. Jednak, do chwili obecnej żadna z prób badania powyższych szczepionek nie została wprowadzona do stosowania [51].

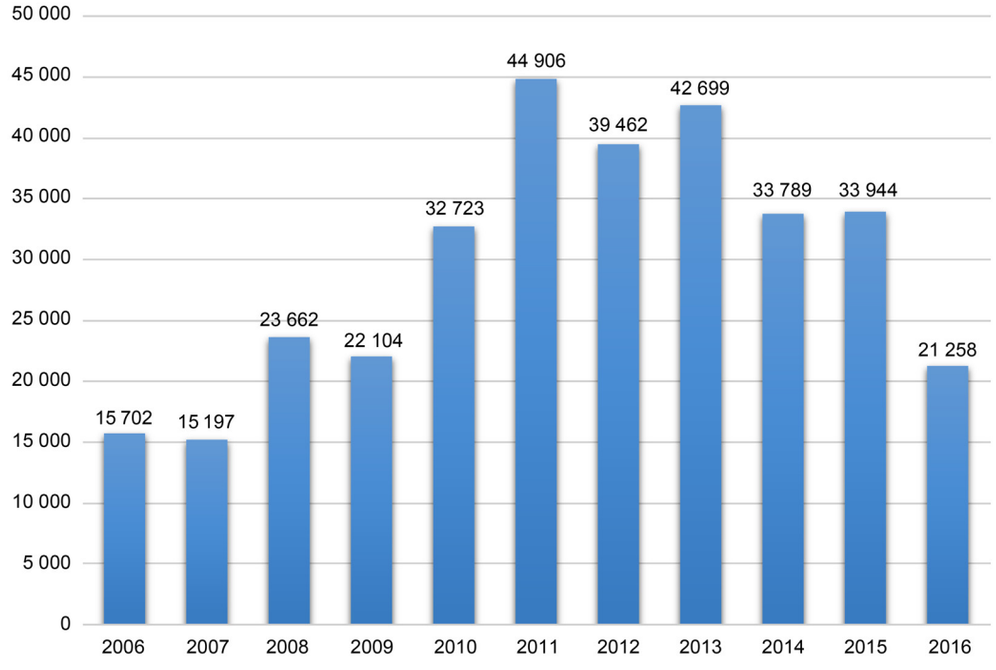
4. Epidemiologia zakażeń rotawirusowych

Zakażenia rotawirusami zostały stwierdzone na wszystkich kontynentach i we wszystkich rasach, ale drogi ich rozpowszechnienia na całym świecie nie zostały dobrze poznane. Według danych WHO infekcje rotawirusowe są najczęstszą przyczyną ostrych biegunek u dzieci poniżej piątego roku życia [13]. W okresie przed wprowadzeniem szczepień praktycznie każde dziecko do 5 roku życia ulegało zakażeniu rotawirusami co najmniej raz. Szacuje się, że przed wprowadzeniem szczepień, na świecie dochodziło do 100–150 mln zachorowań rocznie, z czego około 0,5 mln dzieci umierało. Osiemdziesiąt procent zgonów dzieci z powodu biegunki rotawirusowej wystąpiło w krajach rozwijających się. Wprowadzenie szczepień przeciw infekcjom rotawirusowym w tych krajach doprowadziło do spadku liczby zgonów o połowę [75].

Szacuje się, że w Europie, przed wprowadzeniem na rynek w 2006 r. szczepionek przeciw infekcjom rotawirusowym, rocznie występowało 3,6 mln zachorowań wśród dzieci poniżej 5 roku życia. Wyniki badań opublikowane w 2017 r. wskazują, że w krajach Unii Europejskiej oraz stowarzyszonych hospitalizowanych jest rocznie z powodu infekcji rotawirusowych 300–600 na 100 000 dzieci poniżej piątego roku życia, tj. około 75 000–150 000 hospitalizacji rocznie. Ponadto, 2 do 4 razy więcej dzieci wymaga leczenia ambulatoryjnego z powodu tych zakażeń [33]. Rotawirusy należące do grupy A są odpowiedzialne za ponad 95% przypadków zakażeń wśród dzieci [26].

Według Meldunków Epidemiologicznych opracowanych w Zakładzie Epidemiologii NIZP-PZH w 2016 r. zarejestrowano w Polsce ogółem 21258 zakażeń jelitowych wywołanych przez rotawirusy, najwięcej w kwietniu i maju, z czego 19535 przypadków wymagało hospitalizacji (91,9%), a 16721 przypadków dotyczyło dzieci poniżej 5 r.ż. (78,7%). W roku 2016 w porównaniu z rokiem 2015 było o 12686 mniej zakażeń rotawirusami jednak rejestrowana ilość przypadków w ostatnim dziesięcioleciu utrzymuje się na wysokim poziomie [58]. Liczbę zgłoszonych przypadków zakażeń rotawirusowych w Polsce w latach 2006–2016 przedstawiono na Ryc. 2.

W Stanach Zjednoczonych, przed wprowadzeniem do powszechnego stosowania szczepionki rotawirusowej w 2006 r., u ponad 400 000 małych dzieci diagnozowano choroby wywołane przez rotawirusy, z czego od 55 000 do 70 000 musiało być hospitalizowanych oraz 20 do 60 zmarło [13]. Średnia liczba zakażeń rotawirusowych w porównaniu do lat 2000–2006, była niższa o 16% w 2007 r. i o 45% w 2008 r. Te analizy potwierdziły, że wprowadzenie szczepionki RV5 wiązało się z ogromną redukcją liczby przypadków zapalenia żołądka i jelit wywołanego przez rotawirusy wśród dzieci w USA, niemal natychmiast po wprowadzeniu szczepionki przeciw rotawirusom [25]. Do 2015 roku prawie trzy czwarte amerykańskich dzieci w przedziale wiekowym 19–35 miesięcy otrzymało pełną dawkę szczepienia przeciw rotawirusom, dzięki czemu radykalnie spadły hospitalizacje i wizyty ratunkowe w przypadku zakażeń rotawirusowych (94% do 96% zaszczepionych dzieci jest chronionych przed hospitalizacją) [40]. Dalsze badania wykazały, iż istnieje trend dwuletniej choroby, niezależnie od warunków klinicznych. Ten dwuletni trend pojawił się natychmiast po



Ryc. 2. Liczba zgłoszonych przypadków zakażeń jelitowych wywołanych przez rotawirusy w Polsce w latach 2006–2016

wprowadzeniu szczepionki rotawirusowej, w wyniku której częstość występowania rotawirusa gwałtownie spadła podczas zimy o parzystych latach (np. 2008, 2010, 2012) i wzrosła ponownie w latach nieparzystych (2009, 2011, 2013, itp.), jednak poniżej poziomu obserwowanego podczas ery przedszczepiennej. Uważa się, że obserwowany dwuletni trend w raportach klinicznych i laboratoryjnych wynika z rocznych fluktuacji u podatnych dzieci i skuteczności przenoszenia rotawirusa [66].

W krajach rozwiniętych zakażenie najczęściej ma miejsce do 4 r.ż., natomiast w krajach rozwijających się szczyt zachorowań przypada na okres pomiędzy 4 miesiącem a 2 r.ż [26]. W klimacie umiarkowanym najwięcej przypadków biegunki występuje zimą. Sezonowość choroby rotawirusowej jest mniej widoczna w klimacie tropikalnym, ale zaobserwowano, że jest bardziej rozpowszechniona w suchych i chłodnych miesiącach [33].

Powszechnym źródłem infekcji zarówno dzieci, jak i dorosłych, jest kontakt z zakażonymi dziećmi. Zakażenia wśród dorosłych są zazwyczaj bezobjawowe, a wirus jest bardzo rzadko wykrywany w kale. Występowały jednak wśród dorosłych epidemie ciężkiej choroby, szczególnie w populacjach zamkniętych, takich jak oddziały geriatryczne. Przypadki bezobjawowej infekcji i przypadki z łagodnymi objawami infekcji rotawirusowych odnotowano wśród pielęgniarek pracujących na oddziałach pediatrycznych, co wskazuje, że złe praktyki mycia rąk przez personel pielęgniarski mogą przyczyniać się do rozprzestrzeniania się rotawirusowego zapalenia żołądka i jelit [41].

Epidemiologia zakażeń rotawirusowych została po raz pierwszy zbadana wśród dzieci hospitalizowanych z powodu biegunki w Stanach Zjednoczonych [7]. Rotawirus został zidentyfikowany w próbkach kału 35–50% dzieci poniżej 5 roku życia, u których wystąpiła biegunka. Wtedy zauważono sezonowość zimową i nieliczne przypadki zarejestrowane latem i jesienią. Istotna okazała się zależność dotycząca wieku, ponieważ niewiele dzieci poniżej 3 miesięcy było hospitalizowanych, szczyt wieku hospitalizacji wynosił od 6 miesięcy do 2 lat, a 40% przypadków dotyczyło dzieci w wieku poniżej 1 roku. Gdy przeprowadzono badania etiologiczne u dzieci hospitalizowanych z biegunką w krajach słabo rozwiniętych w bardziej tropikalnym klimacie, epidemiologia okazała się znacząco odmienna [20]. Po pierwsze, choroba miała miejsce przez cały rok, chociaż czasami można było zidentyfikować mały szczyt zimowy, a nawet 80% ciężkich przypadków miało miejsce w pierwszym roku życia [9]. Późniejsze badanie próbek kału dodało dodatkowy wymiar do tych różnic, ponieważ dzieci w krajach rozwiniętych były zazwyczaj zakażone kilkoma powszechnymi szczepami rotawirusów i rzadko miały mieszane infekcje, podczas gdy w krajach słabo rozwiniętych wykryto dużą różnorodność szczepów i nawet jedna trzecia badanych próbek kału zawierała 2 lub więcej szczepów [23, 24, 48]. Obserwacje te sugerowały zwiększoną siłę infekcji i być może inny sposób przenoszenia. Zimowa sezonowość i szybkie rozprzestrzenianie się zakażenia pojedynczym szczepem w krajach rozwiniętych związane były z przenoszeniem rotawirusów w powietrzu lub drogą

kropelkową, podczas gdy w krajach słabo rozwiniętych całoroczna choroba z wieloma szczepami infekującymi niemowlęta we wczesnym okresie życia może wskazywać na większą siłę infekcji i przenoszenie w skażonej wodzie lub źródłach środowiskowych, a także z rozprzestrzenianiem się drogą kropelkową [44].

5. Odporność zbiorowiskowa

Odporność zbiorowiskowa (inaczej ochrona populacyjna, stadna czy grupowa) polega na zmniejszeniu ryzyka zachorowania osobnika nieuodpornionego wraz ze wzrostem odsetka osób uodpornionych w danej populacji. W ten sposób przerwana zostaje transmisja patogenu i osoby nieimmunizowane nie chorują. Pojęcie odporności zbiorowiskowej ma zastosowanie do chorób zakaźnych, które przenoszą się z człowieka na człowieka. Istotnym parametrem skuteczności poszczególnych szczepionek jest tak zwany próg odporności zbiorowiskowej, który definiowany jest, jako odsetek osób zaszczepionych w populacji, po osiągnięciu, którego liczba nowych zakażonych maleje, a w następstwie zmniejsza się liczba chorych. Zasadniczo próg odporności zbiorowiskowej wynosi 90–95%, kiedy to choroba zakaźna przestaje się rozprzestrzeniać. Wskaźnik ten ma różną wartość i zwiększa się dla chorób o wysokiej zaraźliwości, przykładowo dla krztuśca szacowany jest na 92–94%, a dla świnki na 75–86% [88].

Zakażenia rotwirusami należą do chorób o bardzo wysokiej zakaźności. Według Meldunków Epidemiologicznych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny, w Polsce od 1 stycznia do końca marca 2018 r. zgłoszono 6 473 przypadki zachorowań na biegunkę o etiologii rotawirusowej na 13 980 przypadków wszystkich wirusowych zakażeń wywołujących nieżyt żołądkowo-jelitowy [58]. Dlatego też, aby zahamować rozprzestrzenianie się choroby odsetek osób uodpornionych w danej populacji musi być wysoki. Wysoka wyszczepialność powinna być osiągnięta w grupie szczególnie podatnej na zachorowanie, czyli u małych dzieci (do 2 roku życia). Do tego dochodzą zakażenia naturalne w starszych grupach wiekowych, co razem prowadzi do uzyskania odporności zbiorowiskowej [33].

Podczas Piątego Europejskiego Spotkania Ekspertów w sprawie oceny programów szczepień przeciw rotawirusom, zorganizowanego w marcu 2017 r. w Holandii, uczestnicy przedstawili statystyki, które mówią, iż wdrożenie powszechnych szczepień w Europie doprowadziło do redukcji o 60–90% liczby hospitalizacji i wizyt w przychodniach ambulatoryjnych z powodu zakażeń wywołanych przez rotawirusy w populacji dziecięcej. W wielu krajach zauważono zależność między wysoką wyszczepialnością a niższą zapadalnością na zapalenia żołądkowo-jelitowe, gdzie czynnikiem etiologicznym były rotawirusy, dowodząc w ten sposób o powstaniu odporności populacyjnej [29].

Dostępne dowody pośredniej ochrony pochodzą z krajów, w których powszechne szczepienia zostały wprowadzone od 2006 roku. Pierwszym krajem w Europie była Belgia. Dane doświadczalne, zebrane z różnych ośrodków w okresie od 2008 do 2014 r., wykazały spadek zachorowań rotawirusowych u dzieci w wieku 0–2 lata aż o 79% w porównaniu z okresem przed wprowadzeniem szczepień (1999–2006). U dzieci starszych, w wieku powyżej 10 lat, które nie zostały zaszczepione, również zaobserwowano znaczną (o 50%) redukcję liczby potwierdzonych laboratoryjnie przypadków zakażeń, co wskazuje na wytworzenie ochronny pośredniej. Dodatkowo, autorzy publikacji oceniając bezpośredni wpływ szczepionki na liczbę hospitalizacji z powodu rotawirusowych zapaleń żołądkowo-jelitowych stwierdzili znaczne zmniejszenie się (o 87%) liczby hospitalizacji w populacji zaszczepionej i niezaszczepionej, przy czym największy spadek miał miejsce u niemowląt w wieku 6–11 miesięcy (90%) [6]. Podobne wyniki otrzymano w kolejnym badaniu, przeprowadzonym w 12 szpitalach belgijskich w pierwszych dwóch latach po wprowadzeniu szczepień, gdzie zmniejszenie liczby hospitalizacji w grupie wiekowej poddanej szczepieniom wynosiło od 65% do 80%. Zmniejszenie o 20% do 64% zaobserwowano również w grupach wiekowych nie kwalifikujących się do szczepień [50].

Podobny spadek, wynoszący 89%, odnotowano w Austrii, porównując dane zebrane z okresu przed szczepieniami (2002 – czerwiec 2007) i po wprowadzeniu dwóch rodzajów dostępnych szczepionek (lipiec 2007–2012). Wyszczepialność w latach objętych obserwacją była wysoka i wynosiła 72–87%. Odnotowany spadek liczby zachorowań dotyczył wszystkich grup wiekowych branych pod uwagę (0–18 lat) wliczając noworodki poniżej 42 dnia życia, które nie były jeszcze chronione przez podanie szczepionki, co można wytłumaczyć wytworzeniem się odporności populacyjnej [29].

W Finlandii powszechny program szczepień szczepionką RV5 rozpoczął się w 2009 roku i bardzo szybko osiągnięta została wyszczepialność 90%. W latach 2012–2014 liczba wizyt ambulatoryjnych oraz hospitalizacji z powodu ciężkich biegunek rotawirusowych u dzieci spadła z 52% w okresie przed wprowadzeniem Narodowego Programu Immunizacji do 13%, a głównym czynnikiem wywołującym ostre zapalenia żołądkowo-jelitowe w tym czasie był norowirus. Eksperci przewidują, że przy utrzymaniu dużej wyszczepialności aktywność rotawirusów będzie utrzymywała się na niskim poziomie, nie eliminując jed-

nak całkowicie zakażeń wirusem typu dzikiego. Zaobserwowano jednak przesunięcie granicy wieku zakażeń na dzieci w wieku 4–7 lat [29]. Podobne wyniki otrzymał zespół Leino i wsp., [54] przeszukując bazy danych szpitali przed wprowadzeniem szczepień (1999–2005) i po wprowadzeniu szczepień wykazując 79% redukcję wizyt ambulatoryjnych związanych z zakażeniami rotawirusowymi wśród niemowląt poniżej 12 miesięcy oraz redukcję od 30% do 79% w starszych grupach wiekowych, których szczepienia nie obejmowały.

W Norwegii, która do swojego programu szczepień ochronnych szczepionkę wprowadziła nieco później, bo w 2014 roku, obserwacje prowadzono w ciągu dwóch lat. Wyszczepialność również była bardzo wysoka (98% dla dwóch dawek szczepionki), co miało wpływ na znaczny spadek liczby hospitalizacji związany z biegunkami rotawirusowymi u dzieci w wieku poniżej 5 lat w 2016 roku w porównaniu do okresu 2014–2015 [29].

Badania przeprowadzone w Wielkiej Brytanii wykazały znaczną redukcję liczby potwierdzonych zakażeń rotwirusami we wszystkich grupach wiekowych. Największy spadek, wynoszący 77%, stwierdzono u dzieci poniżej 1 roku życia, ale również znaczący spadek zaobserwowano w przypadku osób w wieku podeszłym, tj. 65 lat. Badania rozpoczęto w pierwszym roku po wprowadzeniu szczepień i trwały przez okres 2 lat (2016). Wyszczepialność również była wysoka i wynosiła ponad 90% już w pierwszym roku po wprowadzeniu szczepionki rotawirusowej [29].

Krajem, w którym szczepionki RV1 i RV5 należą nadal do szczepionek zalecanych i nie są refundowane przez Narodowy System Zdrowia, jest Hiszpania, gdzie przy 38% wyszczepialności w 2009 roku również odnotowano zmniejszenie liczy hospitalizacji z powodu rotawirusowego zapalenia żołądka i jelit o 43% u niemowląt poniżej 12 miesięcy. Wskaźnik liczby przyjęć do szpitala u dzieci poniżej 5 lat był nieco niższy i wyniósł 37%. Co ciekawe, w roku 2010 Hiszpańska Agencja ds. Produktów Leczniczych przez 5 miesięcy wstrzymała pozwolenia na wprowadzenie do obrotu nowych serii szczepionek z powodu wykrycia w nich świńskiego wirusa PCV2. W Galicji, gdzie wyszczepialność była na nieco wyższym poziomie niż w pozostałych obszarach Hiszpanii i wynosiła 49% spadła do 22% po okresowym wycofaniu szczepionki. Sytuacja ta spowodowała gwałtowny wzrost liczy hospitalizacji o 260% u dzieci w wieku < 12 miesięcy w 2010–2011 roku. W kolejnych latach, po ponownym przywróceniu szczepionki, liczba ta spadła o 30% [50].

W Polsce szacuje się, że zaledwie 5–10% populacji niemowląt otrzymuje szczepienie przeciw rotawirusom i jest to za niski odsetek, aby efekt odporności zbiorowiskowej mógł być znaczący. W badaniach własnych Pulkowska-Nowocień i wsp. [69] wykazali zwiększony odsetek dzieci zaszczepionych, wynoszący 33,4% w badanej populacji i odsetek ten wzrastał z 8,7% w roku 2006 do 66,6% w roku 2013. Zwiększony stan zaszczepiania autorzy tłumaczą faktem, iż badania prowadzone były w jednej poradni, w dużym mieście (Warszawa), w którym rodzice zaszczepionych dzieci osiągają dochody wyższe niż w pozostałych województwach.

6. Obawy wobec stosowania szczepionek przeciw zakażeniom rotawirusowym

Skutecznym sposobem zapobiegania chorobie rotawirusowej są powszechnie dostępne szczepienia przeciwko rotawirusom. Jednak mimo wielkiego zagrożenia, jakim jest zakażenie, wyszczepialność niemowląt w Polsce jest bardzo niska [64]. Dostępne na rynku farmaceutycznym szczepionki budzą w rodzicach wiele wątpliwości, co do swojej skuteczności oraz bezpieczeństwa. Największy niepokój spowodowany jest przede wszystkim niskim poziomem świadomości wśród społeczeństwa oraz brakiem powszechnego dostępu do rzetelnych informacji. Wszystkie szczepienia wykonywane rutynowo u najmłodszych z każdym rokiem znajdują coraz większą grupę przeciwników oraz krytyków. Pośród zarzutów pod adresem szczepień przeciw zakażeniom rotawirusami najpoważniejszym jest podejrzenie, że stosowane preparaty wywołują poważną chorobę jelit – wgłobienie [80]. Przeciwnicy szczepień łączą chorobę z zastosowaniem preparatów RV1 czy RV5, przez mylne kojarzenie ich ze szczepionką Rotashield stosowaną u dzieci w USA w końcówce lat 90. ubiegłego stulecia, co do której istniało wysokie prawdopodobieństwo powiązania z chorobą [73]. Szczepionka była podawana dzieciom od 6. tygodnia do ukończenia 1. roku życia. Na 1,5 mln zaszczepionych dzieci w 15 przypadkach w ciągu 7 dni po podaniu preparatu wystąpiło wgłobienie jelit, które miało poważne konsekwencje. W związku z czym Center for Diesease Control (CDC) w Atlancie wycofał rekomendację dla szczepionki Rotashield. Naukowcy podjęli pracę nad wyjaśnieniem zaistniałego faktu. Po zbadaniu przypadków choroby oraz przeprowadzeniu dodatkowych analiz stwierdzono, że prawdopodobną przyczyną zwiększenia zachorowalności na wgłobienie jelit u zaszczepionych nie jest sama szczepionka tylko wiek dziecka, w którym mu ją podano. Zbyt późne zaszczepienie niemowlęcia zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia skutków ubocznych w postaci choroby [14]. W związku z czym przy stosowaniu szczepionek RV1 i RV5 zmniejszono górną granicę wieku podawania preparatu [60].

Objawy wgłobienia jelita to wysoka gorączka, ból brzucha, biegunka oraz wymioty, czyli te same jakie towarzyszą zakażeniu rota wirusem, co także według

przeciwników definiuje chorobę jako skutek uboczny preparatów immunologicznych [1]. Patogeneza choroby wskazuje, że wystąpić może ona u niemowlaków z inną anatomiczną budową mięśniówki jelitowej, zbyt długą krezką jelitową czy skłonnością do powstawania polipów. Jednak w 90% przypadków ma ona charakter przypadkowy, bez określonych czynników sprawczych [33]. Fakt ten według przeciwników szczepień również jasno dowodzi silnemu związkowi pomiędzy szczepieniem a chorobą. Jednakże dotychczas nie dowiedziono, że stosowanie obecnie zarejestrowanych preparatów szczepionkowych ma wpływ na występowanie oraz zaostrzenie wgłobienia, mimo że producenci leków w swoich ulotkach proszą o wzmożoną czujność względem dzieci z przebytą chorobą w przeszłości [17]. Jednocześnie wykazano, że częstotliwość występowania choroby u dzieci nieszczepionych oraz poddanych tej procedurze jest porównywalna (patrz rozdział: Szczepionki przeciw zakażeniom rotawirusowym), przez co należy wnioskować, że nie występuje bezpośredni związek pomiędzy preparatami immunologicznymi, a zachorowalnością na wgłobienie [70]. Ciągle prowadzony monitoring skuteczności i bezpieczeństwa szczepionek mający na celu zapewnienie bezpieczeństwa dzieci nie wskazuje, aby zagrożenie wynikające ze szczepień mogło wzrosnąć.

Kolejną obawą, jaką usłyszeć można od rodziców jest podejrzenie, że szczepienia są nieskuteczne. W środowisku naturalnym wyróżnia się siedem różnych rodzajów wirusa, z czego każdy posiada liczne podrodzaje, co oznacza, że rodzina rotawirusów jest ogromna. Dotychczas uznano, że główną przyczyną zakażeń u ludzi są wirusy typu A. Kapsydowe białka VP7 i VP4 rotawirusów typu A są antygenami neutralizującymi, wykorzystywanymi w rozwoju szczepionek oraz badaniu odpowiedzi immunologicznej bezpośredniej lub krzyżowej. Białka te definiują serotyp wirusa. Białko VP7 definiujące serotyp G oraz VP4 definiujące serotyp P pozwoliło na zidentyfikowanie kilku odmian wirusa pośród tych serotypów [6]. Jednakże oba serotypy łączą się ze sobą tworząc liczne kombinacje, z których być może nie wszystkie są jeszcze poznane. Dotychczas zidentyfikowano kilkadziesiąt szczepów wirusa będących kombinacją obu serotypów [35]. Właśnie te liczby powodują największy niepokój pośród rodziców. Jak wiadomo dostępne na rynku szczepionki nie posiadają w swoim składzie tak licznej reprezentacji różnych rodzajów wirusa. Szczepionka RV1 (Rotarix) jest monowalentna i posiada w swoim składzie tylko jeden serotyp należący do grupy G1P, natomiast szczepionka RV5 (RotaTeq) pięć różnych serotypów: G1-G4 i P1, uodparniających na odpowiednie ich kombinacje [16, 17]. Dodatkowo należy zwrócić uwagę, że poszczególne serotypy wirusa są z odpowiednią częstością identyfikowane w różnych częściach świata, a co za tym idzie rodzaj niebezpiecznego patogenu i szczepionka przeciwko niemu wymierzona powinna być charakterystyczna dla odpowiedniej szerokości geograficznej [71]. W przekonaniu przeciwników szczepień jeden, czy też pięć serotypów występujących w szczepionkach jest znikomą częścią odmian krążących w przyrodzie, mogących wywołać ciężkie zakażenie. Dodatkowo różnorodność wirusów w różnych częściach świata w dobie translokacji zwiększa jeszcze bardziej prawdopodobieństwo niedopasowania składu szczepionki względem zapotrzebowania. Argumenty wysuwne przez przeciwników oraz obawy rodziców powodują niski poziom zaufania do powszechnych szczepień przeciwko rotawiurosom, a brak rzetelnych informacji nie rozwiewa wątpliwości i niejasności względem skuteczności szczepień spowodowanej immunologiczną odpowiedzią krzyżową [42]. Na podstawie obserwacji i badań uznano jednak, że szczepionki RV1 i RV5 zmniejszyły zapadalność na ciężką chorobę rotawirusową odpowiednio o 85% i 90%. Dodatkowo dzięki stosowaniu szczepień udało się znacząco zmniejszyć ilość przypadków wymagających hospitalizacji [67]. Fakt ten jednoznacznie wskazuje na bezpodstawność obaw przeciwników szczepień.

Kolejne zarzuty pod adresem szczepień przeciwko rotawirusom mnożą się w rozmowach rodziców oraz na licznych forach internetowych. Dość popularnym argumentem przeciwko szczepieniom jest wprowadzenie zagrożenia dla zdrowia szczepionych niemowląt za sprawą podania żywego patogenu. Wirus podawany w szczepionce jest atenuowany tj. unieszkodliwiony, przez co nie jest zdolny do wywołania silnej choroby rotawirusowej. Według dostępnej wiedzy podanie atenuowanego wirusa do układu pokarmowego dziecka może powodować lekką biegunkę i nudności pacjenta, jednak jest to naturalny objaw poszczepienny, który nie jest niebezpieczny dla dziecka, dlatego nie powinien powodować niepokoju [17]. Szczególną grupą pacjentów, co do których obawy są największe zaliczyć należy wcześniaki. Przeciwnicy szczepień wskazują, że zbyt liczne szczepienia na początku życia osłabiają znacząco organizm dziecka oraz wpływają negatywnie na rozwój ich układu odpornościowego, co w przypadku dzieci urodzonych przed terminem wydaje się być zjawiskiem bardzo niebezpiecznym. Lekarze zwracają jednak uwagę, że to właśnie te dzieci – słabsze z mniejszą masą urodzeniową, częściej hospitalizowane, są szczególnie narażone na zakażenia rotawirusem, a następstwa choroby są dla niech znacznie bardziej niebezpieczne niż dla dzieci urodzonych w terminie. Jednakże pośród obaw rodziców poza zagrożeniem dla zdrowia dziecka pojawiają się obawy o bezpieczeństwo osób z otoczenia szczepionych. Namnożony w układzie pokarmowym wirus może zostać wraz z kałem wydalony z organizmu. Producenci szczepionek wyraźnie

ostrzegają przed taką sytuacją w ulotkach dołączonych do opakowania preparatu. Rzeczywiście wykazano, że zaszczepione niemowlaki mogą wydalać rotawirusy przez około tydzień po podaniu preparatu. Fakt taki notuje się u około 10% pacjentów [16, 17, 33]. Dodatkowo negatywne emocje wzmaga fakt, że rotawirusy są odporne na wysoką temperaturę, liczne środki dezynfekujące czy promieniowanie UV, a to znacząco zwiększa możliwość kontaktu z niebezpiecznym patogenem [53]. Wydalana szczepionka może stać się źródłem zakażenia osób z ich otoczenia, jednakże zachowując wszelkie środki ostrożności i podstawowe zasady higieny osobistej minimalizuje się zagrożenie i praktycznie wyklucza możliwość zachorowania.

7. Podsumowanie

Zakażenia rotawirusami występują na wszystkich kontynentach i są najczęstszą przyczyną ostrych biegunek u dzieci poniżej piątego roku życia. Jedynym skutecznym sposobem zapobiegania tym infekcjom są szczepienia. Obecnie na rynku międzynarodowym dostępne są dwie szczepionki przeciw zakażeniom rotawirusowym: pięciowalentna RotaTeq (RV5) i monowalentna Rotarix (RV1). Istnieje również kilka szczepionek licencjonowanych wyłącznie na rynki krajowe np. w Indiach, Chinach czy Wietnamie. Uzasadnieniem szczepień przeciw rotawirusom jest duża skuteczność szczepionek, bezpieczeństwo ich stosowania oraz wyraźne korzyści zdrowotne, społeczne i ekonomiczne w populacjach objętych powszechnymi szczepieniami.

Piśmiennictwo

1. Albrecht P., Szajewska H.: Choroby przewodu pokarmowego u dzieci. WUM, Warszawa, 2011 s. 247 –225
2. Arora R., Swaminathan S.: Ready to measure impact? The introduction of Rotavirus Vaccine in India. *Indian Pediatr*. **53**, 565–567 (2016)
3. Bernstein D.I., Sack D.A., Rothstein E., Reisinger K., Smith V.E., O'Sullivan D., Spriggs D.R., Ward R.L.: Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89–12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, **354**, 287–290 (1999)
4. Bhandari N., Bhan M.K. 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)
5. Bines J.E., Kirkwood C.D. i wsp.: Safety and immunogenicity of RV3-BB human neonatal rotavirus vaccine administered at birth or in infancy: a randomised, double-blind, placebo--controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 1389–1397 (2015)
6. Bishop R.F., Barnes G.L., Cipriani E., Lund J.S.: Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *New Engl. J. Med.* **309**, 72–76 (1983)
7. Brandt C.D., Parrott R.H. i wsp.: Pediatric viral gastroenteritis during eight years of study. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 71–78 (1983)
8. Breiman R.F., Zaman K., Armah G., Sow S.O., Anh D.D., Victor J.C., Hille D., Ciarlet M., Neuzil K.M.: Analyses of health outcomes from the 5 sites participating in the Africa and Asia clinical efficacy trials of the oral pentavalent rotavirus vaccine. *Vaccine*, **30** (Supl 1), 24–29 (2012)
9. Bresee J.S., Glass R.I., Ivanoff B., Gentsch J.R.: Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. *Vaccine*, **17**, 2207–2222 (1999)
10. Burnett E., Umesh P., Jacqueline T.: Rotavirus vaccines: Effectiveness, safety, and future directions. *Pediatr. Drugs*, **20**, 223–233 (2018)
11. Centers for Disease Control and Prevention.: Intussusception among recipients of rotavirus vaccine – United States, 1998–1999. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **48**, 577–581 (1999)
12. Centers for Disease control and Prevention.: Postmarketing monitoring of intussuspection after RotaTeq vaccination – United States, February 2007. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **56**, 218–222 (2007)
13. Centers for Disease Control and Prevention.: Rotavirus vaccine information statement, https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/rotavirus.html (08.05.2018)
14. Centers for Disease Control and Prevention.: Suspection of Rotawirus vaccine after reports of intussuspection-United States, 1999. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **53**, 786–789 (2004)
15. Centre for Disease Control and Prevention.: Rotavirus surveillance – worldwide, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **60**, 514–516 (2009)
16. Charakterystyka Produktu Leczniczego Rotarix.: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2006/2006022110930/anx_10930_pl.pdf (08.05.2018)
17. Charakterystyka Produktu Leczniczego RotaTeq.: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2006/2006062711652/anx_11652_pl.pdf (08.05.2018)
18. Clark H.F., Bernstein D.I., Dennehy P.H.: Safety, efficacy and immunogenicity of live, quadrivalent human-bovine reasortant rotavirus vaccine in healthy infants. *J. Pediatr.* **144**, 184–190 (2004)
19. Clark H.F., Burke C.J., Volkin D.B.: Safety, immunogenicity and eficacy in healthy infants of G1 and G2 human reasortant rotavirus vaccine in a new stabilizer.buffer liquid formulation. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**, 914–920 (2003)
20. Cook S.M., Glass R.I., LeBaron C.W., Ho M.S.: Global seasonality of rotavirus infections. *Bull. World Health Organ.* **68**, 171–177 (1990)
21. Crawford S.E., Estes M.K. i wsp.: Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*, **3**, 17083 (2017)
22. Cunliffe N.A., Das B.K., Ramachandran M., Bhan M.K., Glass R.I., Gentsch J.R.: Sequence analysis demonstrates that VP6, NSP1 and NSP4 genes of Indian neonatal rotavirus strain 116E are of human origin. *Virus Genes*, **15**, 39–44 (1997)
23. Cunliffe N.A., Dove W., Bunn J.E., Ben Ramadam M., Nyangao J.W., Riveron R.L., Cuevas L.E., Hart C.A.: Expanding global distribution of rotavirus serotype G9: detection in Libya, Kenya, and Cuba. *Emerg. Infect. Dis*. **7**, 890 e2 (2001)
24. Cunliffe N.A., Kilgore P.E., Bresee J.S., Steele A.D., Luo N., Hart C.A., Glass R.I.: Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. *Bull. World Health Organ.* **76**, 525 e37 (1998)
25. Curns A.T., Steiner C.A., Barrett M., Hunter K., Wilson E., Parashar U.D.: Reduction in acute gastroenteritis hospitalizations among U.S. children after introduction of rotavirus vaccine: analysis of hospital discharge data from 18 U.S. states. *J. Infect. Dis.* **201**, 1617–1624 (2010)
26. Czarnecki M., Gładysz A.: Zakażenia rotawirusowe. Puls Medycyny, http://pulsmedycyny.pl/2581182,83427 (08.05.2018)

27. Danchin M., Kirkwood C.D., Lee K.J., Bishop R.F., Watts E., Justice F.A., Clifford V., Cowley D., Buttery J.P., Bines J.E.: Phase I trial of RV3-BB rotavirus vaccine: a human neonatal rotavirus vaccine. *Vaccine,* **31**, 2610–2016 (2013)
28. Dang D.A., Nguyen V.T., Vu D.T., Nguyen T.H., Nguyen D.M., Yuhuan W., Baoming J., Nguyen D.H., Le T.L., Rotavin-M1 Vaccine Trial Group.: A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine*, **30** (Supl 1), 114–121 (2012)
29. de Hoog M.L.A., Vesikari T., Giaquinto C., Huppertz H.I., Martinon-Torres F., Bruijning-Verhagen P.: Report of the 5th European expert meeting on rotavirus vaccination (EEROVAC). *Hum. Vaccin. Immunother*. **14**, 1027–1034 (2018)
30. De Vos B., Vesikari T., Linhares A.C., Salinas B., Pérez-Schael I., Ruiz-Palacios G.M., Guerrero Mde L., Phua K.B., Delem A., Hardt K.: A rotavirus vaccine for prophylaxis of infants against rotavirus gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J*. **23**, 179–182 (2004)
31. Delem A., Lobmann M., Zygraich N.: A bovine rotavirus developed as a candidate vaccine for use in humans. *J. Biol. Stand*. **12**, 443–445 (1984)
32. Dhingra M.S., Saluja T. i wsp.: Evaluation of safety and immunogenicity of a live attenuated tetravalent (G1-G4) Bovine--Human Reassortant Rotavirus vaccine (BRV-TV) in healthy Indian adults and infants. *Vaccine*, **32** (Supl 1), 117–123 (2014)
33. European Centre for Disease Prevention and Control.: ECDC Expert opinion on rotavirus vaccination in infancy. Stockholm: ECDC (2017)
34. Garbag-Chenon A., Fontaine J.L., Lasfargues G., Clark H.F., Guyot J., Le Moing G., Hessel L., Bricout F.: Reactogenicity and immunogenicity of rotavirus WC3 vaccine in 5–12 month old infants. *Res. Virol.* **140**, 207–217 (1989)
35. Gentsch, J. R., Glass R.I.: Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* **192** (Supl 1), 146–159 (2005)
36. Gothefors L., Wadell G., Juto P., Taniguchi K., Kapikian A.Z., Glass R.I.: Prolonged efficacy of rhesus rotavirus vaccine in Swedish children. *J. Infect. Dis*. **159**, 753–757 (1989)
37. Groome M., Cryz S. i wsp.: Safety and immunogenicity of a parental P2-VP8-P[8] subunit rotavirus vaccine in toddlers and infants in south Africa: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 843–853 (2017).
38. Heaton P.M., Ciarlet M.: The pentavalent rotavirus vaccine: Discovery to licensure and beyond. Vaccines, Stanley Plotkin. *Clin. Infect. Dis*. **45**, 1618–1624 (2007)
39. Heliwich E.: Biegunki dziecięce (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka, red. A. Baumann-Popczyk, M. Sadkowska-Todys, A. Zieliński, alfa-medica press, Bielsko--Biała, 2014, s. 24–27
40. Hill H.A., Elam-Evans L.D., Yankey D., Singleton J.A., Dietz V.: Vaccination coverage among children aged 19–35 months – United States, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 1065–1071 (2016)
41. Hjelt K., Grauballe P.C., Henriksen L., Krasilnikoff P.A.: Rotavirus infections among the staff of a general paediatric department. *Acta Paediatr. Scand*. **74**, 617–618 (1985)
42. Hoshino, Y., Kapikian A.Z.: Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J. Health Popul. Nutr*. **18**, 5–14 (2000) https://www.sabin.org/12th-international-rotavirus-symposium-presentations (08.05.2018)
43. Isanaka S., Grais R.F. i wsp.: Efficacy of a low-cost, heat-stable oral rotavirus vaccine in Niger. *New Engl. J. Med.* **376**, 1121–1130 (2017)
44. Jiang V., Jiang B., Tate J., Parashar U.D., Patel M.M.: Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. *Hum. Vaccines,* **6**, 532–542 (2010)
45. Jin-song L., Bing C., Han-chun G., Dan-di L., Lin L., LI-li L., Na L., Zhao-Jun D.: Faecal shedding of rotavirus vaccine in Chinese children after vaccination with Lanzhou lamb rotavirus vaccine. *Scientific Reports*, **8**, 1001 (2008)
46. Joensuu J., Koskenniemi E., .Pang X.L., Vesikari T.: Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reasortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet*, **350**, 1205–1209 (1997)
47. Jonesteller C.L., Burnett E., Yen C., Tate J.E., Parashar U.D.: Effectiveness of Rotavirus Vaccination: A systematic review of the first decade of global post-licensure data, 2006–2016. *Clin. Infect. Dis.* **65**, 840–850 (2017)
48. Kang G., Kelkar S.D., Chitambar S.D., Ray P., Naik T.: Epidemiological profile of rotaviral infection in India: challenges for the 21st century. *J. Infect. Dis.* **192**, 120–126 (2005)
49. Kapikian A., Hoshino Y.,Chanosk R., Perez-Schael I.: Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed ar preventing severe rotavirus diarrhoea in infants and young children. *J. Infect. Dis*. **174**, 65–72 (1996)
50. Karafillakis E., Hassounah S., Atchison C.: Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in Europe, 2006–2014. *Vaccine*, **33,** 2097–2107 (2015)
51. Kirkwood CD, Ma LF, Carey ME, Steele AD.: The rotavirus vaccine development pipeline. *Vaccine*, DOI: 10.1016/j.vaccine. 2017.03.076 (2017).
52. Korycka M.: Epidemiologia zakażeń rotawirusowych u dzieci, *Przegl. Epidemiol*. **55**, 275–279 (2001)
53. Kramer A., Schwebke I., Kampf G.: How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infectious Diseases, 16.08.2006, http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/130/prepub (10.04.2018)
54. Leino T., Ollgren J., Salo H., Tiihonen P., Kilpi T.: First year experience of rotavirus immunisation programme in Finland. *Vaccine*, **31**, 176–182 (2012)
55. Lopez A.L., Raguindin P.F. i wsp.: Impact of rotavirus vaccine introduction in Agusan Del Sur, Philippines. Twelfth International Rotavirus Symposium, 7–9.09.2016 ,
56. Luna E.J., Frazatti-Gallina N.M., Timenetsky M.C., Cardoso M.R., Veras M.A., Miraglia J.L., Escobar A.M., Grisi S.J., Raw I., Precioso A.R.: A phase I clinical trial of a new 5- valent rotavirus vaccine. *Vaccine*, **31**, 1100–1105 (2013)
57. Madhi S.A., Neuzil K.M. i wsp.: Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *New Engl. J. Med.* **362**, 289–298 (2010)
58. Meldunki Epidemiologiczne NIZP-PZH http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html#01 (08.05.2018)
59. Moon S., Wang Y., Edens C., Gentsch J.R., Prausnitz M.R., Jiang B.: Dose sparing and enhanced immunogenicity of inactivated rotavirus vaccine administered by skin vaccination using a microneedle patch. *Vaccine*, **31**, 3396–3402 (2013)
60. Mrukowicz J., Szajewska H., Vesikari T.: Options for the prevention of rotavirus disease other than vaccination. *J. Pediatr. Gastr. Nutr*. **46** (Supl 2), 32–37 (2008)
61. Mrukowicz J.: Szczepienie przeciwko rotawirusom w praktyce lekarskiej. Aktualny (2017) stan wiedzy. *Medycyna Praktyczna – Szczepienia*, **4**, 64–86 (2017)
62. Murphy T., Gargiullo P.M., Wharton M.: More on rotavirus vaccination and intussuspection. *New Eng. J. Med.* **436**, 564–572 (2002)
63. Naik S.P., Zade J.K., Sabale R.N., Pisal S.S., Menon R., Bankar S.G., Gairola S., Dhere R.M.: Stability of heat stable, live attenuated Rotavirus vaccine (ROTASIIL®) *Vaccine*, **35**, 2962–2969 (2017)

64. Państwowa Inspekcja Sanitarna: Stan sanitarny kraju w roku 2016, https://gis.gov.pl/images/Stan_sanitarny_kraju_2016.pdf (08.05.2018)
65. PATH: Phase I/II Descending Age Study of P2VP8 subunit parental rotavirus vaccine in Healthy Toddlers and Infants 2014, https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02109484 (08.05.2018)
66. Payne D.C., NVSN i wsp. Direct and indirect effects of rotavirus vaccination upon childhood hospitalizations in 3 U.S. counties, 2006–2009. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 245–253. (2011)
67. Penelope H.: Dennehy Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clin. Microbiol. Rev.* **21** 198–208 (2008)
68. Perez-Schael I., Gountinas M.J., Perez M., Pagone V., Rojas A.M., Gonzales R., Cunto W., Hoshino Y., Kapikan Z.: Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalnet vaccine in infants and Young children In Venezuela. *New Engl. J. Med.* **337**, 1181–1187 (1997)
69. Pulkowska-Nowocień A., Prędota D., Topczewska-Cabanek A., Życińska K., Wardyn K.A., Nitsch-Osuch A.: Stan zaszczepienia dzieci przeciw rotawirusom w wybranej poradni Podstawowej Opieki Zdrowotnej w Warszawie w latach 2006–2013. *Fam. Med. Primary Care Rev*. **16**, 353–355 (2014)
70. Ruiz-Palacios G.M., O'Ryan M. i wsp.: Safety and efficacy of a nattenuated vaccine againstsevere rotavirus gastroenteritis. *New Engl. J. Med.* **354**, 11–22 (2006)
71. Santos N., Hoshino Y.: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* **15**, 29–56 (2005)
72. Santosham M., Davidson B.L. i wsp.: Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reasortant rotavirus vaccine in native American populations. *J. Pediatr.* **131**, 632–638 (1997)
73. Schwartz J.L.: The First Rotavirus Vaccine and the Politics of Acceptable Risk. *Milbank Q.* **90**, 278–310 (2012)
74. Senturia Y.D., Peckham C.S., Cordery M., Chrystie I.A., Banatvala J.E., Abdree F.E.: Live attenuated oral ratavirus vaccine. *Lancet*, **2**, 1091 (1987)
75. Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Parashar U.D.: Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013. *Clin. Infect. Dis.* **62** (Supl 2), 96–105 (2016)
76. Trang V.N., Braeckman T., Lernout T., Hau T.V., Anhle T.K., Luan le T., Van Damme P., Anh D.D.: Prevalence of rotavirus antibodies in breast milk and inhibitory effects to rotavirus vaccines. *Hum. Vacc. Immunother*. **10**, 3681–3687 (2014)
77. Velázquez F.R., Verstraeten T. i wsp.: Postmarketing surveillance of intussusception following mass introduction of the attenuated human rotavirus vaccine in Mexico. *Pediatr. Infect. Dis. J*. **31**, 736–744 (2012)
78. Vesikari T., Giaquinto C., Huppertz H.: Clinical trials of rotavirus vaccines in Europe. *Pediatr. Infect. Dis. J*. **25**, 42–47(2006)
79. Vesikari T., Heaton M.D. i wsp.: Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *New Engl. J. Med*. **354,** 23–33 (2006)
80. Vesikari T., Isolauri E., D'Hondt E., Delem A., Zissis G.: Protection of infants againts rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet*, **1**, 977–981 (1984)
81. Vesikari T., Isolauri E., Delem A., d'Hondt E., André F.E., Beards G.M., Flewett T.H.: Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine strain in infants vaccinated before rotavirus epidemic. *J. Pediatr.* **107**, 189–194 (1985)
82. Vesikari T., Maki M., Isolauri E.: Epidemiologic beckground for the need of rotavirus vaccine in Finland: preliminary experience of RIT 4237 strain of live attenuated rotavirus vaccine in adults. *Dev. Biol. Stand.* **53**, 229–236 (1983)
83. Vesikari T., Ruuska T., Delem A., Andre F.E.: Neonatal rotavirus vaccination with RIT 4237 bovine rotavirus vaccine: a preliminary report. *Pediatr. Infect. Dis. J*. **6**, 164–169 (1987)
84. Vesikari T., Ruuska T., Delem A., Andree F.E., Beards G.M., Flewett T.H.: Efficacy of two doses RIT 4237 bovine rotavirus vaccine (at birth and 7 months of age) for prevention of rotavirus diarrhoea. *Acta Peadiatr. Scand.* **80**, 173–180 (1991)
85. World Health Organization: Rotavirus vaccines. WHO position paper – January 2013-Recomendations. *Weekly Epidemiol. Rec.* **88**, 49–64 (2013)
86. Zaman K., Victor J.C. i wsp.: Effectiveness of a live oral human rotavirus vaccine after programmatic introduction in Bangladesh: A cluster-randomized trial. *Plos Med.* **14**, e1002282 (2017)
87. Zhen S.S., Wang X.Y. i wsp.: Effectiveness of the live attenuated rotavirus vaccine produced by a domestic manufacturer in China studied using a population-based case-control design. *Emerg. Microbes Infec.* **4,** e64 (2015)
88. Zieliński A.: Odporność zbiorowiskowa, (w) Wakcynologia, red. W. Magdzik, D. Naruszewicz-Lesiuk, A. Zieliński, alfa-medica press, Bielsko-Biała, 2007, s. 50–57

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 328–337
http://www.pm.microbiology.pl

TEORIA ZAGROŻENIA ORAZ CZĄSTECZKI NIEBEZPIECZEŃSTWA

Agata Poniewierska-Baran[1], Beata Tokarz-Deptuła[1]*, Wiesław Deptuła[2]

[1] Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński
[2] Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w sierpniu 2018 r.

Streszczenie: Układ odpornościowy ssaków rozwinął wiele mechanizmów pozwalających na skuteczną walkę z czynnikami obcymi, w tym patogenami. W 1994 roku Polly Matzinger ogłosiła teorię zagrożenia, nowy pogląd w immunologii, opisujący w jaki sposób układ odpornościowy reaguje na zagrożenie organizmu, spowodowane uszkodzeniem, ale także i obecnością patogenów. Teoria ta wnosi odmienne spojrzenie na obowiązujący dotychczas pogląd, według której układ odpornościowy rozróżnia struktury własne od obcych i reaguje wyłącznie na czynniki obce. Według teorii zagrożenia, układ odpornościowy posiada zdolność weryfikacji czynników bezpiecznych i niebezpiecznych, a więc teoria ta tłumaczy reakcje immunologiczne powstające m.in. na skutek uszkodzenia tkanek, określane „sterylnym zapaleniem", ale także powstające w czasie zakażenia. Podstawowym i fundamentalnym elementem w tej teorii są cząsteczki sygnalizujące niebezpieczeństwo lub uszkodzenie – cząsteczki DAMP (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns), uwalniane z uszkodzonych lub martwych tkanek, choć są one także obecne w stanach fizjologicznych, które warunkują analogiczną odpowiedź immunologiczną do tej, która zgodna jest z założeniami self/non-self.

1. Wstęp. 2. Teoria zagrożenia. 3. Cząsteczki zagrożenia-niebezpieczeństwa. 4. Charakterystyka wybranych cząsteczek zagrożenia – niebezpieczeństwa. 5. Podsumowanie

DANGER THEORY AND DAMAGE-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS

Abstract: The immune system of mammals has developed many mechanisms to effectively defend itself against foreign factors, including pathogens. In 1994, Polly Matzinger published a theory of danger, a new view in immunology, describing the response of the immune system to danger, caused by trauma and/or presence of pathogens. This theory sheds a different view on the current belief, that the immune system distinguishes between own (self) and foreign (non-self) structures and reacts only to non-self factors. According to the danger theory, the immune system has the ability to verify "safe" and "dangerous" factors, thus explaining immune reactions caused by tissue damage, referred to as "sterile inflammation", but also occurring during the infection. It is believed that the fundamental elements in danger theory are dangerous molecules i.e. – damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are released from damaged or dead tissue and cells. They are also present in physiological conditions and give analogous immune response to these induced by self/ non-self factors.

1. Introduction. 2. Danger theory. 3. Damage-associated molecular patterns. 4. Characteristics of selected damage-associated molecular patterns. 5. Summary

Słowa kluczowe: teoria zagrożenia, cząsteczki zagrożenia, DAMP
Key words: danger theory, danger factors, DAMP

1. Wprowadzenie

Układ odpornościowy (UO) ssaków, w tym człowieka, stanowi najważniejszą linię obrony przed czynnikami obcymi, w tym drobnoustrojami. Według dotychczas głoszonej teorii w immunologii, podstawową i swoistą funkcją UO jest rozróżnianie cząsteczek swoich/własnych (self) od obcych (non-self), co wiąże się z koniecznością rozpoczęcia reakcji wobec substancji obcych – w tym patogenów. Kluczową rolę w funkcjonowaniu UO ssaków, pełnią mechanizmy odpowiedzi wrodzonej, często utożsamiane z odpowiedzią nieswoistą, która zapewnia szybką, ale niespecyficzną reakcję, w przeciwieństwie do odpowiedzi nabytej, która jest specyficzna, ale powstaje później. W 1994 roku Polly Matzinger, opublikowała pracę pt. „Tolerance, danger, and the extended family" [63], w której przedstawiła nowy pogląd dotyczący funkcjonowania UO, zwany teorią zagrożenia, odmienną od dotychczasowych założeń w immunologii (self/non-self). Podstawowymi elementami w ogłoszonej teorii są cząsteczki zagrożenia – niebezpieczeństwa – DAMP (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns), nazywane także sygnałami niebezpieczeństwa (danger signals) lub alarminami (alarmins). Ich obecność powoduje rozpoczęcie reakcji UO, pomimo, iż są to często własne – endogenne elementy makroorganizmu (Tabela I). Rozpoznanie przez UO czynników DAMP, a także molekularnych wzorców związanych z patogenami – PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns), występujących na bakteriach, wirusach, grzybach i pierwotniakach, możliwe jest dzięki receptorom PRR (Pattern Recognition Receptors) obecnym na komórkach UO [55], co prowadzi do aktywacji układu odpornościowego. Klasycznym

* Autor korespondencyjny: Dr hab. Beata Tokarz-Deptuła, prof. US, Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3C, 71-412 Szczecin; tel. 91 444 1605; e-mail: beata.tokarz-deptula@usz.edu.pl

przykładem receptorów PRR są m.in. receptory toll-podobne – TLR (Toll-Like Receptors), stanowiące ogniwo łączące odporność swoistą z nieswoistą. Do tej grupy należą także receptory lektynowe typu C – CLR (C-Type Lectin Receptors), receptory RIG-I-podobne – RLR (RIG-I-Like Receptors), cytozolowe receptory DNA – CDS (Cytosolic DNA Receptors) oraz receptory NOD-podobne – NLR (NOD-Like Receptors) [54].

2. Teoria zagrożenia

W 1960 roku Burnet i Medawar otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny, za opisanie zjawiska tolerancji immunologicznej, według której fundamentalną zasadą działania UO, jest zdolność odróżniania antygenów własnych (self) od obcych (non-self) [13]. Hipotezę tą sformułowali kilka lat wcześniej Burnet i Fenner [14], zakładając, że jeżeli w trakcie rozwoju embrionalnego, wszczepione zostaną komórki, pochodzące od genetycznie odrębnej rasy zwierząt, to nie powinna rozwijać się odpowiedź i produkcja przeciwciał przeciwko obcym cząsteczkom. Niestety, autorzy ci nie byli w stanie udowodnić swojej hipotezy eksperymentalnie i dopiero w 1953 roku potwierdzono ją, badając mysie splenocyty wszczepione do zarodków myszy „odległych" od siebie genetycznie ras [7]. Osobniki takie nabywały cech myszy-dawców, przykładowo osobniki dorosłe (myszy-biorcy) akceptowały przeszczep skóry i innych tkanek, ale tylko od gatunku myszy-dawcy. Tymczasem teoria zagrożenia [63] zakłada, że dla UO ważniejsze od rozpoznania czynników obcych dla organizmu, jest rozpoznanie czynników niebezpiecznych (DAMP) i ich prezentacja. Według tej teorii, antygen może być zignorowany przez UO, jeśli nie zostanie uznany za niebezpieczny dla organizmu i w takim wypadku nie rozwinie się odpowiedź immunologiczna doprowadzająca do jego eliminacji. Tak więc, w procesie rozpoznawania antygenu, powinien pojawić się sygnał zagrożenia-niebezpieczeństwa (DAMP), który pozwoli na prawidłową interpretację zaistniałej sytuacji i podjęcie odpowiednich czynności. Tymi sygnałami są elementy własnych komórek i tkanek organizmu, wydzielane m.in. w trakcie ich uszkodzenia, urazu lub w czasie infekcji (Tabela I). Teoria zagrożenia, mimo iż kontrowersyjna, to przez wielu badaczy jest akceptowana, bo wyjaśnia m.in. zjawisko uruchomienia odpowiedzi immunologicznej w wyniku oddziaływania własnych, endogennych elementów organizmu, powstałych np. w trakcie uszkodzenia tkanek [63, 107]. Wiadomo, że przy ciężkim urazie, czy zabiegu operacyjnym przeprowadzonym w warunkach jałowych, może dojść do tzw. „sterylnego zapalenia", które mimo, że powstaje wyłącznie w wyniku uszkodzenia tkanek, charakteryzuje się typowymi objawami zapalenia powstającymi w czasie infekcji, takimi jak zaczerwienienie, podwyższenie temperatury, obrzęk i ból [66]. W trakcie tego stanu, dochodzi do obumierania komórek, co powoduje gromadzenie się efektorowych elementów odporności wrodzonej, m.in. komórek PMN (Polymorphonuclear Cells), które likwidując go, rozpoczynają „fizjologiczne gojenie" uszkodzonych tkanek [50]. Ze względu na olbrzymi arsenał występujących w komórkach PMN związków, powodujących m.in. hydrolizę i utlenianie, może również dojść do dużego zniszczenia otaczających tkanek [90]. Tłumaczy to występowanie zmian patologicznych w odpowiedzi na „sterylne zapalenie", które stwierdzane jest m.in. w urazach, niedokrwieniach i zawałach, autoagresji, a nawet uszkodzeniach wątroby wywołanych przez leki [50, 60, 97]. Stąd ważnym faktem w zrozumieniu roli wrodzonych elementów odpornościowych w tych stanach, jest ich udział w reakcji na uszkodzenia tkanek i „sterylne zapalenie", co prowadzić może do zespołu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej – SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), który to stan klinicznie przypomina reakcję m.in. podczas posocznicy [23]. Dodatkowo dowiedziono że przedłużające się „sterylne zapalenie" w organizmie, może stać się przyczyną stanów chorobowych, pozornie ze sobą niepowiązanych, począwszy od choroby Alzheimera [5], przez stłuszczenie wątroby [43], aż po miażdżycę [38], czy dnę moczanową [16]. Wiadomo, że w czasie „sterylnego zapalenia" pojawiające się czynniki DAMP, wzmagają reakcje układu odpornościowego, poprzez aktywację komórek prezentujących antygen – APC (Antigen-Presenting Cell), które wyłapują cząsteczki DAMP z otaczającego środowiska i po przejściu do węzłów chłonnych, przekazują go dziewiczym limfocytom T. Ponieważ tylko komórki APC, mogą pobudzać limfocyty T dziewicze, a co za tym idzie, zapoczątkować odpowiedź pierwotną, dlatego właśnie komórki APC muszą rozpoznać sygnał zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP). Jeśli sygnał zagrożenia zostanie odebrany przez komórki APC (sygnał pierwszy), wówczas dochodzi do ekspresji cząsteczek drugiego sygnału aktywujących limfocyty Th, co prowadzi w konsekwencji do rozwoju reakcji odpornościowej. Cząsteczki drugiego sygnału, czyli tzw. sygnału kostymulacji, obecne są na komórce prezentującej antygen. Łącząc się z odpowiednimi cząsteczkami na limfocycie T, wzmagają efekt prezentacji i stymulacji komórek T. Szczególnie efekt ten dotyczy cząsteczki CD28 na limfocycie T, łączącej się z cząsteczkami CD80 i CD86 na komórce APC, a także semaforyny łączące się z CD72 i z pleksynami, jak również cząsteczkami TIM-1 i -3. Do aktywacji limfocytu T potrzebne są także sygnały przekazywane przez cytokiny, np. IFN typu I, IL-1, -12, -18. Wpływ tych dodatkowych oddziaływań na aktywację limfocytów T nazywany jest „sygnałem II". Jeśli natomiast sygnał DAMP

Tabela I
Czynniki zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP)

Źródło	*Nazwa DAMP	Receptory	Piśmiennictwo
Czynniki DAMP uwalniane w trakcie nekrozy komórek	Białka szoku cieplnego (HSP70, HSP90, HSP60, HSP72, HSP90B1)	CD91, TLR2, TLR4, SREC-1 I FEEL-1	[12]
	Adenozyno-trifosforan (ATP)	P2Y2, P2X7	[35]
	Mitochondrialne DNA (MtDNA)	TLR9	[31]
	Białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (HMGB1)	TLR2, TLR4, RAGE, TIM3	[40]
	IL-1α	IL-1R	[20]
	IL-33	ST2	[41]
	Katelicydyny/LL-37	FPRL1, TLR7,8,9, P2X7, EGFR, MRGX2, CXCR2	[111]
	Defensyny (α, β)	CCR2, CCR6, TLR4	[111]
	Białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (HMGN1)	TLR4	[103]
	Białko S100	RAGE	[36]
	Interferon (IFN)	TLR3	[6]
	Reaktywne formy tlenu (ROS)	brak danych	[77]
	Prostaglandyna E2 (PGE_2)	EP1-4	[39]
	Jony potasu (K+)	–	[25]
	Kalretikulina (CARL)	LRP1	[73]
	Granulizyna	TLR4	[56]
	Neurotoksyna pochodząca z eozynofilów (EDN)	TLR2	[111]
	Kwasy nukleinowe, dsRNA, dsDNA	TLR3, TLR7/8, TLR9	[32]
	Cyklofolina A	CD147	[53]
	Cytochrom C	LPG	[79]
	F-aktyna	DNGR-1/ $CLEC_9A$	[3]
	Galektyny	TLR2	[48]
	Tioredoksyna	NLRP3	[119]
	Kwas moczowy	purynergiczne	[92]
	Peptydy N-formylowane (NFP)	FPR1	[18]
	Histony	TLR9	[45]
	Ligand prog. śmierci (PD-L1)	PD-1	[118]
	Peroksyredoksyna –1 (Prx1)	TLR4	[85]
Czynniki DAMP uwalniane w trakcie apoptozy komórek	Białka szoku cieplnego (HSP70, HSP90, HSP60, HSP72,HSP90B1)	CD91, TLR2, TLR4, SREC-1 I FEEL-1	[12]
	Adenozyno-trifosforan (ATP)	P2Y2, P2X7	[35]
	Defensyny (α, β)	CCR2, CCR6, TLR4	[111]
	Nadtlenek wodoru (H_2O_2)	brak danych	[77]
	Aneksyna 1(ANXA1)	FPR-1	[105]
	Fosfatydyloseryna (PtdSer)	TIM-1/-3/-4, BAI1, Stabilin-2, MFG-E8, C1q	[46]
	Kardiolipina	brak danych	[93]
	Sfingozyno-1-fosforan (S1P) i ceramido-1-fosforan (C1P)	brak danych	[51]
	Lizofosfatydylocholina (LPC)	G2A	[58]
	Kalretikulina (CARL)	CD91	[73]
	Domena śmierci (DD1α)	DD1α	[116]
	Trombospondyna 1 (THBS1)	$\alpha_v\beta_3$	[52]
	Kwasy nukleinowe, dsRNA, dsDNA	TLR3, TLR7/8, TLR9	[32]
	Ligand programowanej śmierci (PD-L1)	PD-1	[118]
	Peroksyredoksyna -1 (Prx1)	TLR4	[85]

Tabela I. C.d.

Źródło	*Nazwa DAMP	Receptory	Piśmiennictwo
Czynniki DAMP proteolizy macierzy zewnątrz--komórkowej	Hialuronian	TLR2, TLR4	[89]
	Fibronektyna	TLR4	[89]
	Fibrynogen	TLR4	[89]
	Biglycan	TLR2, TLR4, P2X4, P2X7	[89]
	Siarczan heparanu	TLR4	[89]
	Tenascin C	TLR4	[37]
	Wersykan	TLR2, TLR6, CD14	[89]

* Kolejność DAMP – wg ilości faktów i danych w cytowanym piśmiennictwie.

nie zostanie odebrany przez komorki APC i nie dojdzie do ekspresji cząsteczek drugiego sygnału z udziałem limfocytów Th, co prowadzi do anergii klonalnej i/lub apoptozy limfocytów Th. Oprócz rozpoznania i prezentacji przez komórki APC czynników DAMP, ważnym aspektem w teorii zagrożenia jest także sposób w jaki UO decyduje o efektorowym charakterze odpowiedzi na te czynniki. Związane jest to z rodzajem odpowiedzi typu komórkowego lub humoralnego organizmu, oraz klasy wytwarzanych przeciwciał [78]. Również odpowiedź UO na DAMP, zależy od rodzaju tkanki w której zachodzi, bo np. w oku, czy przewodzie pokarmowym, może dochodzić do lokalnego hamowania odpowiedzi przez specyficzne mediatory, np. transformujący czynnik wzrostu TGF-β (Transforming Growth Factor β1) [65]. Jest to także ważny fakt w teorii zagrożenia, który odróżnia ją od obowiązującego poglądu w immunologii, z którego wynika, że charakter fazy efektorowej odpowiedzi immunologicznej, zależy wyłącznie od czynnika wywołującego tę odpowiedź [1].

3. Cząsteczki zagrożenia-niebezpieczeństwa

Cząsteczki związane z zagrożeniem-niebezpieczeństwem (DAMP) (Tabela I), to w zasadzie własne – endogenne czynniki inicjujące odpowiedź immunologiczną [6], które pochodzą z uszkodzonych i/ lub martwych komórek, jak również z komórek będących w stanie stresu biologicznego – zakażenia, co za każdym razem oznacza zagrożenie i niebezpieczeństwo dla gospodarza [6]. Badania przedstawione przez zespół Matzinger [30], wskazują, że cząsteczki DAMP w rzeczywistości są sygnałami stresu dla komórek UO. Prowadzi to do uwalniania endogennych substancji i sygnałów, które aktywują komórki rozpoznające antygen. Wykazano także, że sygnały niebezpieczeństwa – zagrożenia (DAMP) mogą także bezpośrednio aktywować komórki dendrytyczne – DC, makrofagi, neutrofile, komórki NK oraz komórki T z receptorem γδ [30]. Cząsteczki DAMP mogą także wpływać na dojrzewanie komórek DC i neutrofili, jak również wspomagać opsonizację i pochłanianie umierających komórek nowotworowych [35]. Opisano wśród czynników DAMP i takie, które nie wykazują działania aktywującego na elementy UO, pozostają neutralne lub nawet działają hamująco [34, 61]. Wykazano, że cząsteczki DAMP takie jak np. aneksyna 1 (ANXA1), fosfatydyloseryna (PtdSer), domena śmierci (DD1α), prostanglandyna E2 (PGE2), jony potasu (K^+) oraz niektóre cząsteczki obecne w macierzy zewnątrzkomórkowej, np. hialuronian, fibronektyna A, czy fibrynogen – odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy tkankowej, mogą prowadzić nawet do unikania odpowiedzi immunologicznej i działać immunosupresyjnie [61]. Opisano również, że niektóre cząsteczki DAMP, np. białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej – HMGB1 (High Mobility Group Box 1), ulega specyficznym potranslacyjnym modyfikacjom – utlenianiu lub cytrulinacji, które mogą dezaktywować, wzmacniać lub zmieniać jego właściwości immunogenne [87]. Większość alarmin działa jednak immunostymulująco na elementy UO, m.in. wiążąc się do swoistych receptorów PRR, takich jak receptory TLR [6, 72], purynergiczne receptory P2, białka związane z receptorem lipoproteiny o niskiej gęstości (LRP1), formylowe receptory (FPR1) lub receptory zaawansowanej glikacji endoproteinowej (RAGE) [34].

Wiadomo, że czynniki stresu – potencjalne czynniki DAMP, mogą mieć charakter fizyczny (mechaniczny i termiczny), chemiczny (toksyny) oraz biologiczny (zakażenie) i każdorazowo mogą prowadzić do śmierci komórki, w tym martwicy i apoptozy [33, 24], w trakcie których uwalniają się cząsteczki DAMP (Tabela I) [33, 61]. Dodać należy, że nekroza powstająca w wyniku urazu, uszkodzenia lub wywołana obecnością zarazków i toksyn, jest procesem charakteryzującym się utratą integralności błony. Apoptoza natomiast, jest procesem, który może wystąpić także jako zjawisko fizjologiczne [61, 80], stąd odpowiedź – reakcja gospodarza na te dwie formy śmierci komórki jest odmienna [50]. Nekroza powoduje odpowiedź zapalną [61], czego nie obserwuje się podczas apoptozy, gdyż przebiega ona

z zachowaniem ciągłości błon, a wewnątrzkomórkowa zawartość komórki nie jest uwalniana [46]. Niezależnie, że proces komórek podlegających tym dwóm typom śmierci jest odmienny, to elementy uwalniane w wyniku tych procesów są szybko „przejmowane" przez komórki UO, w procesie fagocytozy – w przebiegu nekrozy, m.in. przez rezydujące tam komórki PMN oraz poprzez proces eferocytozy makrofagów – w przypadku apoptozy [27]. W trakcie tych dwóch procesów, komórki UO uwalniają wiele czynników DAMP (Tabela I), które działają modulująco na elementy UO poprzez wytwarzanie mediatorów zapalenia, choć także i takich substancji jak IL-10 i TGF-β, które hamują stan zapalny [46]. Wykazano, że uwolnione w czasie nekrozy i apoptozy cząsteczki DAMP, cechują się na tyle harmonijnym i skoordynowanym działaniem, że może prowadzić to do powstania stanu zapalnego, obejmującego różne układy i narządy, tworząc w konsekwencji tzw. sieć zapalenia [94, 95].

4. Charakterystyka wybranych cząsteczek zagrożenia – niebezpieczeństwa

Wśród cząsteczek zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP) (Tabela I), jednymi z lepiej opisanych są białka wstrząsu cieplnego – HSP (Heat Shock Proteins) [12, 17, 64, 65, 75, 81, 100]. Białka te wbrew nazwie, nie są wytwarzane jedynie w odpowiedzi na oparzenie czy przegrzanie organizmu, ale ich synteza następuje także w wyniku zadziałania na komórkę czynników uszkadzających [100]. Obecność HSP stwierdzono podczas nekrozy, wywołanej przez niesprzyjające warunki dla funkcjonowania komórki lub wywołanej obecnością patogenów. Białka te, pojawiają się także w wyniku działania innych cząsteczek DAMP, jak np. fibronektyny – elementu macierzy zewnątrzkomórkowej, uwalnianej z uszkodzonych tkanek, która aktywując receptor TLR4, prowadzi do rozpoznania i zaprezentowania HSP [17]. Wykazano, że białko HSP – jako cząsteczka DAMP, pozwala na wykrycie przez makroorganizm zagrożenia, nawet wtedy, gdy patogen, powodujący ten stan, nie został jeszcze wykryty przez UO [17]. Zatem białka te, stanowią niezwyklą cząsteczkę DAMP, która w zasadzie nie występuje poza macierzą komórek w prawidłowych – fizjologicznych warunkach [17]. Niezależnie jednak od przyczyn pojawienia się HSP poza komórką, białka te aktywują komórki APC, co jest sygnałem do rozpoczęcia odpowiedzi immunologicznej, choć HSP mogą działać również jako chaperony w zakresie odporności adaptacyjnej [75]. Wykazano, że podwyższony poziom białka HSP70, występujący m.in. w wyniku ciężkiego, traumatycznego uszkodzenia mózgu, powoduje reakcje prozapalne, poprzez zwiększenie ilości cząsteczek adhezyjnych oraz wydzielanie przez komorki UO cytokin i chemokin [22, 81]. Wzrost poziomu białek HSP występuje także przy rozległych zabiegach chirurgicznych i urazach, co powoduje zwiększenie poziomu prokalcytoniny w surowicy [67], wzrost stężenia glukozy oraz liczby białych krwinek [88, 115]. Wysoki poziom białek HSP może towarzyszyć infekcji, stąd przyjmuje się, że poznanie kinetyki uwalniania HSP, to droga prowadząca do wykorzystania ich, jako biomarkerów pomocnych w monitorowaniu, diagnozowaniu, a nawet leczeniu różnych stanów patologicznych [84].

Ważną cząsteczką DAMP jest również ATP, podstawowa jednostka energii wykorzystywana w metabolizmie komórkowym. Uszkodzone komórki, m.in. w wyniku stresu fizycznego, chemicznego, czy biologicznego (zakażenia), wydzielają ATP, który staje się cząsteczką DAMP, ostrzegając komórki UO o nadchodzącym zagrożeniu i mobilizując szybką reakcję zapalną [35]. Jak wykazano, zaostrzona reakcja zapalna u ludzi na bakterie płytek nazębnych, prowadzi do chorób przyzębia [76], a powstający stan zapalny powoduje uszkodzenia tkanek, czego konsekwencją jest uwalnianie wewnątrzkomórkowego ATP do przestrzeni pozakomórkowej. To pozakomórkowe ATP, jest przykładem cząsteczki DAMP u organizmów wielokomórkowych, wydzielany jest każdorazowo podczas uszkodzeń, w celu wywołania reakcji zapalnych, choć także w czasie rozpoczęcia procesu gojenia, poprzez stymulację receptorów purynergicznych [15]. Dowiedziono, że pozakomórkowy ATP, poprzez sygnalizację receptora P2X7, jest jednym z najlepiej działających aktywatorów inflamasomu Nlrp3, który pośredniczy w wytwarzaniu cytokin zapalnych, takich jak IL-1β [47, 50, 96]. Badania McDonald i wsp. [66], wykazały, że myszy, którym podano przeciwciała rekombinowanego antagonisty receptora IL-1 (IL-1R), który blokował IL-1β, posiadały zwiększoną adhezję oraz zmniejszoną zdolność migracji neutrofili, przez co neutrofile nie podążały do miejsc zapalnych [66].

Inną bardzo istotną cząsteczką zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP) jest mitochondrialne DNA (MtDNA), które aktywuje UO głównie ze względu na pochodzenie ewolucyjne i uderzające podobieństwa między mitochondriami i bakteriami. Według teorii endosymbiotycznej, bakterie zdolne do prowadzenia wymiany gazowej, włączone zostały do komórek eukariotycznych w wyniku endocytozy [99]. Ze względu na podobieństwo aktywacji szlaków molekularnych, zarówno w zakażeniu bakteryjnym, jak i przy urazie makroorganizmu, może dojść do pojawienia się cząsteczek zagrożenia (DAMP), powstania odpowiedzi immunologicznej, a nawet wystąpienia zespołu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej – SIRS [28, 59, 114]. Mimo, że nie udało się ustalić bezpośredniego związku pomiędzy rozwojem SIRS, a uwalnianiem składników mitochondrialnych podczas uszkodzenia komórek

i urazu, to wykazano, że poziom MtDNA jest znacząco podwyższony u rannych pacjentów. Dowiedziono, że cząsteczki DAMP pochodzenia mitochondrialnego, odgrywają rolę w chorobach serca, zapaleniu stawów, chorobach wątroby, urazach, a także wspomnianej reakcji SIRS u ludzi [57, 74, 98]. W badaniach prowadzonych na myszach wykazano również, że MtDNA podawane zwierzętom powoduje SIRS i uszkodzenie płuc. W związku z tym przyjęto hipotezę, że uwolnienie MtDNA, może być brakującym elementem związku między uszkodzeniami tkanki, a tzw. sterylnym zapaleniem, a nawet SIRS [82]. Jako przykład, wykazano, że stan związany z udarem mózgu, czy stan występujący podczas rozległych złamań, w czasie którego dochodzi do uwalniania MtDNA do krążenia, często prowadzi do rozwoju ostrego uszkodzenia płuc. Stwierdzono, że u pacjentów z urazem i SIRS, w mitochondriach zmniejsza się produkcja cząsteczek ATP, co w konsekwencji powoduje wyczerpanie jego zasobów i śmierć komórki [80]. Udowodniono, że podczas urazu, reakcji zapalnej i SIRS, zwiększa się również mitochondrialna produkcja reaktywnych form tlenu – ROS, które mogą regulować poziom jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB w komórkach odpornościowych i w ten sposób wywoływać reakcję zapalną [80]. To mitochondrialne DNA uwalniane w trakcie urazu, może także w sposób bezpośredni aktywować neutrofile, poprzez wiązanie się z ich receptorem TLR9, powodując aktywację wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego p38 MAPK [104, 117]. Nadto obecność MtDNA powoduje, że komórki MN (Mononuclear Cells) wydzielają cytokiny prozapalne, choć cząsteczki MtDNA są również bezpośrednimi mediatorami indukcji apoptozy podczas urazów czy SIRS [80]. Wykazano, że podczas SIRS dochodzi nie tylko do aktywacji szlaku kinazy białkowej RIPK [23], ale także „kompleksu sygnalizacyjnego" prowadzącego do martwicy [23, 108]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że delecja kinazy RIPK3 u myszy, chroni je przed śmiercią w przebiegu sterylnych zapaleń i SIRS [23]. U zwierząt z niedoborem RIPK3, stwierdzono, że poziom MtDNA w osoczu jest niski, co sugeruje związek między brakiem RIPK3, a mniejszym uszkodzeniem tkanek [23]. Mitochondria zatem, oprócz funkcji generowania ATP i udziale w apoptozie, odgrywają ważną rolę w aktywowaniu wrodzonej odporności, ponieważ zawierają składniki ich przodków bakteryjnych, które są potencjalnie immunogenne [10].

Następną ważną cząsteczką DAMP jest prozapalne białko HMGB1 [101], znane głównie jako czynnik transkrypcyjny lub białko jądrowe wiążące DNA [69]. Białko to występuje powszechnie we wszystkich typach komórek jądrzastych, a jego wydzielanie z monocytów może być stymulowane przez PAMP, cytokiny i czynnik aktywujący składnik dopełniacza – C5a [86]. Białko HMGB1 uwalniane jest również z komórek nekrotycznych, przez co dochodzi do pobudzenia odporności wrodzonej [69]. Wykazano, że po pierwotnej retencji jądrowej w komórkach apoptotycznych, ze względu na zwiększoną przepuszczalność komórkową i degradację nukleosomów, HMGB1 jest uwalniane podczas późniejszych faz apoptozy [40]. Białko to, w stanach zapalnych, wykazuje plejotropowe działanie w narządach, bo m.in. wpływa na aktywację komórek fagocytujących oraz komórek śródbłonka, ale także warunkuje utratę funkcji barierowych nabłonka, co prowadzi do typowych objawów zapalenia i wystąpienia stanu patologicznego [102]. HMGB1, poprzez aktywację chemotaksji komórek UO, angiogenezę naczyń, dojrzewania komórek dendrytycznych, a także rekrutację i proliferację komórek macierzystych, promuje procesy obrony, naprawy i regeneracji tkanek [49]. Białko to, wzmacnia odpowiedź zapalną poprzez wiązanie endogennych i egzogennych mediatorów zapalenia, takich jak cytokiny oraz LPS (Lipopolysaccharide) [2, 91], choć stan zapalny promowany przez to białko, zachodzi z udziałem receptora stanu redoks, towarzyszącego cząsteczce HMGB1 [40]. Wykazano, że białko HMGB1 oddziałuje poprzez receptory TLR i RAGE na komórki uczestniczące w inicjowaniu szybkiej i długotrwałej reakcji zapalnej. W procesie nekrozy komórek, w tym komórek nowotworowych, białko HMGB1 może być wydzielane w sposób bierny [26, 83] i jest to wówczas typowa cząsteczka DAMP [101]. Dodać należy, że ginące komórki nowotworowe wydzielając cząsteczki DAMP w postaci białka HMGB1, choć także HSP, ATP, czy białka S100 wiążącego wapń, „programują" charakter śmierci pozostałych komórek [50].

To, czy śmierć tych komórek będzie miała charakter immunogenny – aktywacja odpowiedzi UO skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym, czy nieimmunogenny – niezdolny do takiej odpowiedzi, zależy w dużym stopniu od aktywności cząsteczek DAMP. Stwierdzono, że unikanie odpowiedzi immunologicznej przez komórki nowotworowe jest wynikiem blokowania sygnałów DAMP, uwalnianych z umierających i martwych komórek. Wykazano, że w trakcie immunologicznej śmierci mysich linii komórek nowotworowych, dochodzi do uwalniania takich cząsteczek DAMP, jak HSP70 i HSP90 [29] oraz kalretikuliny (CARL) [73]. Natomiast w procesie śmierci komórek nowotworowych, wywołanych przez chemioterapeutyki (Doksorubicynę, Mitoksantron, Oksaliplatynę czy Bortezomib), dochodzi do uwalniania białka HMGB1 [4], aneksyny A1 (ANXA1) [106] oraz ATP [68].

Innymi cząsteczkami DAMP, których obecność świadczy o rozpoczęciu odpowiedzi odpornościowej, są interleukiny, np. IL-1α i IL-33, które mają podwójną funkcję, gdyż są one pozakomórkowymi mediatorami zapalenia oraz dodatkowo wewnątrzkomórkowymi

czynnikami transkrypcyjnymi [41]. Ponadto IL-33 jest jedną z pierwszych cząsteczek DAMP, które „alarmują" komórki UO o naruszeniu przez patogeny bariery obronnej nabłonka jelitowego [11, 42, 62], choć również interleukina ta uczestniczy w procesie polaryzacji komórek Th2 [62]. W momencie zagrożenia, spowodowanego np. wniknięciem patogenu do makroorganizmu, IL-33 aktywuje komórki wrodzonej odpowiedzi immunologicznej do rozpoczęcia odpowiedzi typu 2 – z udziałem komórek Th2, a także aktywuje syntezę IL-4, -5, -9 i -13, które są istotne, np. przy odbudowaniu bariery naruszonej poprzez patogeny [21]. IL-33 jest zatem wyjątkową cytokiną, gdyż działa jako tradycyjna cytokina zewnątrzkomórkowa oraz jądrowy czynnik transkrypcyjny.

Dodać należy, że wiele cząsteczek zagrożenia, takich jak np. katelicydyny/LL-37, defensyny, HMGN1 (High Mobility Group Nucleosome Binding Domain 1), białko S100 oraz charakteryzowane wcześniej białko HMGB1, wykazują bezpośrednie działanie przeciw-drobnoustrojowe, eliminując patogeny i wpływając na kształtowanie mikroflory makroorganizmu, która reguluje odpowiedź immunologiczną [36, 109, 111]. Wykazano, że katelicydyna – peptyd należący do naturalnych białek AMP, pobudza receptory TLR7, 8, 9 [39] lub P2X7 [19] występujące na neutrofilach, makrofagach, komórkach DC i fibroblastach, prowadząc do produkcji mediatorów zapalenia, takich jak TNFα, IFNα (Interferon) czy PGE2, a nadto aktywuje migrację neutrofili, monocytów oraz limfocytów T [111, 113], przez co warunkują wczesną odpowiedź organizmu na zagrożenie. Zarejestrowano, że pacjenci z atopowym zapaleniem skóry, typowym zapalnym schorzeniem obejmującym komórki Th-2, nie produkują katelicydyny/LL-37 z powodu wysokiego poziomu IL-4 i IL-13, co powoduje znaczne zmniejszenie u nich odporności przeciwwirusowej [44]. Także defensyny, jako cząsteczki DAMP należące do naturalnych antybiotyków, chronią skórę, błony śluzowe przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego i układu oddechowego, działając przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo, ale także przeciwgrzybiczo i przeciwpasożytniczo [70]. Peptydy te aktywują komórki DC poprzez receptory TLR4 lub TLR7/8/9 do produkcji TNFα, IL-6 czy IFN [8], przez co wzmagają odporność. Wykazano, że β-defensyny aktywują u człowieka, królika i świnki morskiej, degranulację komórek tucznych, co prowadzi do uwolnienia histaminy i prostaglandyny D2 (PGD2) – mediatorów stanu zapalnego [71]. Wykazano także, że mysia β-defensyna stymuluje niedojrzałe komórki DC i ich dojrzewanie, a ludzka α-defensyna wprowadzona do hodowli mysich makrofagów zwiększa zdolność tych komórek do fagocytozy. Także białko HMGN1, swoje bezpośrednie działanie jako cząsteczka DAMP, wiąże z odpowiedzią związaną głównie z limfocytami Tc [109] i Th1 [110], choć także wzmaga odporność przeciwnowotworową [9, 103, 112], czego dowodem jest występowanie grasiczaka i innych złośliwych guzów u myszy z niedoborem tego białka. Również białko S100, podobnie jak HMGN1, wzmaga odporność przeciwnowotworową, aktywując komórki DC i makrofagi [33, 36]. Wykazano, że białko S100 hamując aktywność tych komórek, powoduje rozrost linii nowotworowych [109].

5. Podsumowanie

Teoria zagrożenia i związane z nią cząsteczki zagrożenia – niebezpieczeństwa (DAMP), wyjaśniają pewne zjawiska w patofizjologii, trudne do wytłumaczenia w oparciu o obowiązującą teorię self/non-self, chociażby uszkodzenie tkanek wskutek urazu, zjawisko „sterylnego zapalenia", czy też zrozumienie przebiegu niszczenia komórek w wyniku stresu fizycznego, chemicznego, czy biologicznego. Elementy tej teorii – cząsteczki DAMP, mają swoją rolę i udział w uzupełnieniu wiedzy dotyczącej utrzymania homeostazy immunologicznej organizmu oraz rozwoju odpowiedzi UO, m.in. w uszkodzeniach, infekcjach, a także w procesie nowotworzenia.

Piśmiennictwo

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.: Cellular and molecular immunology, wyd. 4., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000
2. Abraham E.: Unraveling the role of high mobility group box protein 1 in severe trauma. *Critical Care*, **13**, 1004 (2009)
3. Ahrens S., Schulz O. i wsp.: F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity*, **36**, 635–645 (2012)
4. Apetoh L., Zitvogel L. i wsp.: The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol. Rev.* **220**, 47–59 (2007)
5. Banjara M., Ghosh C.: Sterile Neuroinflammation and Strategies for Therapeutic Intervention. *Int. J. Inflam.* **2017**, 8385961 (2017)
6. Bianchi M.E.: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leuk. Biol.* **81**, 1–5 (2007)
7. Billingham R.E., Brent L., Medawar P.B.: Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, **172**, 603–606 (1953)
8. Biragyn A., Kwak L.W. i wsp.: Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*, **298**, 1025–1029 (2002)
9. Birger Y., Catez F., Furusawa T., Lim J.H., Prymakowska-Bosak M., West K.L., Postnikov Y.V., Haines D.C., Bustin M.: Increased tumorigenicity and sensitivity to ionizing radiation upon loss of chromosomal protein HMGN1. *Cancer Res.* **65**, 6711–6718 (2005)
10. Bonawitz N.D., Clayton D.A., Shadel G.S.: Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol. Cell*. **24**, 813–825 (2006)

11. Bonilla W.V., Pinschewer D.D. i wsp.: The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral $CD8^+$ T cell responses. *Science*, **335**, 984–989 (2012)
12. Borges T.J., Lang B.J., Lopes R.L., Bonorino C.: Modulation of alloimmunity by heat shock proteins. *Front. Immunol*. **7**, 303 (2016)
13. Burnet F.M.: Immunological recognition of self. Nobel Lecture, (1960)
14. Burnet F.M., Fenner F.: The production of antibodies, wyd. 2, Macmillan, Melbourne, 1949
15. Burnstock G., Fredholm B.B., North R.A., Verkhratsky A.: The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol*. **199**, 93–147 (2010)
16. Busso N., So A.: Mechanisms of inflammation in gout. *Arthritis Res. Ther*. **12**, 206 (2010)
17. Calderwood S.K., Stevenson M.A., Murshid A.: Heat shock proteins, autoimmunity and cancer treatment. *Autoimmune Dis*. **2012**, 486069 (2012)
18. Carp H.: Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J. Exp. Med*. **155**, 264–275 (1982)
19. Chotjumlong P., Bolscher J.G., Nazmi K., Reutrakul V., Supanchart C., Buranaphatthana W., Krisanaprakornkit S.: Involvement of the P2X7 purinergic receptor and c-Jun N-terminal and extracellular signal-regulated kinases in cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 induction by LL-37. *J. Innate Immun*. **5**, 72–83 (2013)
20. Cohen I., Rider P., Carmi Y., Braiman A., Dotan S., White M.R., Voronov E., Martin M.U., Dinarello C.A., Apte R.N.: Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2574–2579 (2010)
21. Cohen E.S., Mustelin T. i wsp.: Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat. Commun*. **6**, 8327 (2015)
22. Da Rocha A.B., Regner A. i wsp.: Serum Hsp70 as an early predictor of fatal outcome after severe traumatic brain injury in males. *J. Neurotrauma*, **22**, 966–977 (2005)
23. Duprez L., Takahashi N., van Hauwermeiren F., Vandendriessche B., Goossens V.: RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity,* **35**, 908–918 (2011)
24. Działo J., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Excitotoxicity and Wallerian degeneration as a processes related to cell death in nervous system. *Arch. Ital. Biol*. **151**, 67–75 (2013)
25. Eil R., Restifo N.P. i wsp.: Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature*, **537**, 539–543 (2016)
26. Ellerman J.E., Brown C.K., de Vera M., Zeh H.J., Billiar T., Rubartelli A., Lotze M.T.: Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin. Cancer Res*. **13**, 2836–2848 (2007)
27. Elliott M.R., Koster K.M., Murphy P.S.: Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. *J. Immunol*. **198**, 1387–1394 (2017)
28. Faist E., Wichmann M.W.: Immunology in the severely injured. *Der Chirurg*, **68**, 1066–1070 (1997)
29. Fucikova J., Spisek R. i wsp.: Prognostic and predictive value of DAMPs and DAMP – associated processes in cancer. *Front. Immunol*. **6**, 402 (2015)
30. Gallucci S., Lolkema M., Matzinger P.: Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med*. **5**, 1249–1255 (1999)
31. Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G.: Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **13**, 780–788 (2012)
32. Ganguly D., Chamilos G., Lande R., Gregorio J., Meller S., Facchinetti V., Homey B., Barrat F.J., Zal T., Gilliet M.: Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med*. **206**, 1983–1994 (2009)
33. Garg A.D., Agostinis P.: Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. *Immunol. Rev*. **280**, 126–148 (2017)
34. Garg A.D., Agostinis P. i wsp.: Molecular and translational classifications of DAMPs in immunogenic cell death. *Front. Immunol*. **6**, 588 (2015)
35. Garg A.D., Agostinis P. i wsp.: A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J*. **31**, 1062–1079 (2012)
36. Ghavami S., Kerkhoff C., Los M., Hashemi M., Sorg C., Karami-Tehrani F.: Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J. Leukoc. Biol*. **76**, 169–175 (2004)
37. Goh F.G., Piccinini A.M., Krausgruber T., Udalova I.A., Midwood K.S.: Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. *J. Immunol*. **184**, 2655–2662 (2010)
38. Grasset E.K., Duhlin A., Agardh H.E., Ovchinnikova O., Hägglöf T., Forsell M.N., Paulsson-Berne G., Hansson G.K., Ketelhuth D.F., Karlsson M.C.: Sterile inflammation in the spleen during atherosclerosis provides oxidation-specific epitopes that induce a protective B-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2030–2038 (2015)
39. Hangai S., Ao T., Kimura Y., Matsuki K., Kawamura T., Negishi H., Nishio J., Kodama T., Taniguchi T., Yanai H.: PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3844–3849 (2016)
40. Harris H.E., Andersson U., Pisetsky D.S.: HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev. Rheumatol*. **8**, 195–202 (2012)
41. Hirsiger S., Simmen H.P., Werner C.M., Wanner G.A., Rittirsch D.: Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators Inflamm*. **2012**, 315941 (2012)
42. Hodzic Z., Schill E.M., Bolock A.M., Good M.: IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory. *Cytokine*, **100**, 1–10 (2017)
43. Hoque R., Farooq A., Mehal W.Z.: Sterile inflammation in the liver and pancreas. *J. Gastroenterol. Hepatol*. **28**, 61–67 (2013)
44. Howell M.D., Gallo R.L., Boguniewicz M., Jones J.F., Wong C., Streib J.E., Leung D.Y.: Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity*, **24**, 341–348 (2006)
45. Huang H., Tsung A. i wsp.: Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*, **54**, 999–1008 (2011)
46. Huynh M.L., Fadok V.A., Henson P.M.: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest*. **109**, 41–50 (2002)
47. Iyer S.S., Sutterwala F.S. i wsp.: Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20388 (2009)
48. Jouault T., El Abed-El Behi M., Martínez-Esparza M., Breuilh L., Trinel P.A., Chamaillard M., Trottein F., Poulain D.: Specific recognition of Candida albicans by macrophages requires galectin-3 to discriminate Saccharomyces cerevisiae and needs association with TLR2 for signaling. *J. Immunol*. **177**, 4679–4687 (2006)
49. Klune J.R., Dhupar R., Cardinal J., Billiar T.R., Tsung A.: HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med*. **14**, 476–484 (2008)
50. Kono H., Rock K.L.: How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol*. **8**, 279 (2008)

51. Korbelik M., Banáth J., Sun J., Canals D., Hannun Y.A., Separovic D.: Ceramide and sphingosine-1-phosphate act as photodynamic therapy-elicited damage-associated molecular patterns: cell surface exposure. *Int. Immunopharmacol.* **20**, 359–365 (2014)
52. Krispin A., Bledi Y., Atallah M., Trahtemberg U., Verbovetski I., Nahari E., Zelig O., Linial M., Mevorach D.: Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states. *Blood*, **108**, 3580–3589 (2006)
53. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P.: Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **12**, 860–875 (2012)
54. Kumar H., Bot A.: In this tissue: Innate immunity and infectious diseases-an update. *Int. Rev. Immunol*. **36**, 55–56 (2017)
55. Kumar H., Kawai T., Akira S.: Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol*. **30**, 16–34 (2011)
56. Kumar J., Okada S., Clayberger C., Krensky A.M.: Granulysin: a novel antimicrobial. *Expert Opin Investig Drugs*, **10**, 321–329 (2001)
57. Lam N.Y., Rainer T.H., Chiu R.W., Joynt G.M., Lo Y.M.: Plasma mitochondrial DNA concentrations after trauma. *Clin. Chem*. **50**, 213–216 (2004)
58. Lauber K., Wesselborg S. i wsp.: Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, **113**, 717–730 (2003)
59. Lenz A., Franklin G.A., Cheadle W.G.: Systemic inflammation after trauma. *Injury*, **38**, 1336–1345 (2007)
60. Liu Z.X., Han D., Gunawan B., Kaplowitz N.: Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, **43**, 1220 (2006)
61. Majno G., Joris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol*. **146**, 3–15 (1995)
62. Martin N.T., Martin M.U.: Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin *Nat. Immunol*. **17**, 122–131 (2016)
63. Matzinger P.: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol*. **12**, 991–1045 (1994)
64. Matzinger P.: An innate sense of danger. *Semin. Immunol*. **10**, 399–415 (1998)
65. Matzinger P.: The danger model: a renewed sense of self. *Science*, **296**, 301–305 (2002)
66. McDonald B., Pittman K., Menezes G.B., Hirota S.A., Slaba I., Waterhouse C.C., Beck P.L., Muruve D.A., Kubes P.: Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, **330**, 362–366 (2010)
67. Meisner M., Tschaikowsky K., Hutzler A., Schick C., Schüttler J.: Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med*. **24**, 680–684 (1998)
68. Michaud M., Kroemer G. i wsp.: Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, **334**, 1573–1577 (2011)
69. Muller S., Scaffidi P., Degryse B., Bonaldi T., Ronfani L.: New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J*. **20**, 4337–4340 (2001)
70. Niedźwiedzka-Rystwej P., Deptuła W.: Defensins: An important innate element of the immune system in mammals. *Post. Hig. Med. Dosw*. **62**, 524–529 (2008)
71. Niyonsaba F., Someya A., Hirata M., Ogawa H., Nagaoka I.: Evaluation of the efects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur. J. Immunol*. **31**, 1066–1075 (2001)
72. Nishiya T., DeFranco A.L.: Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem*. **279**, 19008–19017 (2004)
73. Obeid M., Kroemer G. i wsp.: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med*. **13**, 54–61 (2007)
74. Oka T., Otsu K. i wsp.: Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*, **485**, 251–255 (2012)
75. Osterloh A., Breloer M.: Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition. *Med. Microbiol. Immunol*. **197**, 1–8 (2008)
76. Page R.C., Engel L.D., Narayanan A.S., Clagett J.A.: Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. *JAMA*, **240**, 545–550 (1978)
77. Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P. i wsp.: Long-distance apoptotic killing of cells is mediated by hydrogen peroxide in a mitochondrial ROS-dependent fashion. *Cell Death Differ*. **12**, 1442–1444 (2005)
78. Ptak W., Ptak M., Płytycz B.: Co rozpoznaje układ immunologiczny? Na drodze do nowego paradygmatu. *Kosmos*, **2–3**, 149–156 (2003)
79. Pullerits R., Bokarewa M., Jonsson I.M., Verdrengh M., Tarkowski A.: Extracellular cytochrome c, a mitochondrial apoptosis-related protein, induces arthritis. *Rheumatology*, **44**, 32–39 (2005)
80. Power C., Fanning N., Redmond H.P.: Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock*, **18**, 197–211 (2002)
81. Prohászka Z., Singh M., Nagy K., Kiss E., Lakos G., Duba J., Füst G.: Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. *Cell Stress Chaperones*, **7**, 17–22 (2002)
82. Raoof M., Zhang Q., Itagaki K., Hauser C.J.: Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1. J. Trauma, **68**, 1328–1332 (2010)
83. Raucci A., Palumbo R., Bianchi M.E.: HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity*, **40**, 285–289 (2007)
84. Ren B., Zou G., Huang Y., Xu G., Xu F., He J., Zhu H., Yu P.: Serum levels of HSP70 and other DAMP proteins can aid in patient diagnosis after traumatic injury. *Cell Stress Chaperones*, **21**, 677–686 (2016)
85. Riddell J.R., Wang X.Y., Minderman H., Gollnick S.O.: Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. *J. Immunol*. **184**, 1022–1030 (2010)
86. Rittirsch D., Ward P.A. i wsp.: Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med*. **14**, 551–557 (2008)
87. Rondas D., Mathieu C. i wsp.: Citrullinated glucose-regulated protein 78 is an autoantigen in type 1 diabetes. *Diabetes*, **64**, 573–586 (2015)
88. Rovlias A., Kotsou S.: The blood leukocyte count and its prognostic significance in severe head injury. *Surg. Neurol*. **55**, 190–196 (2001)
89. Schaefer L.: Extracellular matrix molecules: endogenous danger signals as new drug targets in kidney diseases. *Curr. Opin. Pharmacol*. **10**, 185–190 (2010)
90. Segal A.W.: How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol*. **23**, 197–223 (2005)
91. Sha Y., Zmijewski J., Xu Z., Abraham E.: HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J. Immunol*. **180**, 2531–2537 (2008)
92. Shi Y., Evans J.E., Rock K.L.: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, **425**, 516–521 (2003)
93. Sorice M., Circella A., Cristea I.M., Garofalo T., Di Renzo L., Alessandri C., Valesini G., Esposti M.D.: Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis. *Cell Death Differ*. **11**, 1133–1145 (2004)
94. Tesniere A., Apetoh L., Ghiringhelli F., Joza N., Panaretakis T., Kepp O., Schlemmer F., Zitvogel L., Kroemer G.: Immunogenic

cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 504–511 (2008)
95. Tesniere A., Panaretakis T., Kepp O., Apetoh L., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G.: Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* **15**, 3–12 (2008)
96. Tschopp J., Schroder K.: NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 210 (2010)
97. Tsung A., Sahai R., Tanaka H., Nakao A., Fink M.P., Lotze M.T., Yang H., Li J., Tracey K.J., Geller D.A., Billiar T.R.: The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.* **201**, 1135–1143 (2005)
98. Walko T.D. III, Bola R.A., Hong J.D., Au A.K., Bell M.J., Kochanek P.M., Clark R.S., Aneja R.K.: Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA: a novel DAMP in pediatric traumatic brain injury. *Shock*, **41**, 499–503 (2014)
99. Wallin I.E.: A note on the morphology of bacteria symbiotic in the tissues of higher organisms. *J. Bacteriol.* **7**, 471–474 (1922)
100. Wallin R.P., Lundqvist A., Moré S.H., von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H.G.: Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* **23**, 130–135 (2002)
101. Wang H., Tracey K.J. i wsp.: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, **285**, 248–251 (1999)
102. Wang H., Yang H., Tracey K.J.: Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J. Intern. Med.* **255**, 320–331 (2004)
103. Wei F., Yang D., Tewary P., Li Y., Li S., Chen X., Howard O.M., Bustin M., Oppenheim J.J.: The alarmin HMGN1 contributes to antitumor immunity and is a potent immunoadjuvant. *Can. Res.* **74**, 5989–5998 (2014)
104. West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S.: Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 409–437 (2006)
105. Weyd H., Abeler-Dörner L., Linke B., Mahr A., Jahndel V., Pfrang S., Schnölzer M., Falk C.S., Krammer P.H.: Annexin A1 on the surface of early apoptotic cells suppresses CD8+ T cell immunity. *Plos One*, **8**, e62449 (2013)
106. Vacchelli E., Kroemer G. i wsp.: Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science*, **350**, 972–978 (2015)
107. Vance R.E.: A Copernican revolution? Doubts about the danger theory. *J. Immunol.* **165**, 1725–1728 (2010)
108. Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., Kroemer G.: Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714 (2010)
109. Yang D., Han Z., Oppenheim J.J.: Alarmins and immunity. *Immunol. Rev.* **280**, 41–56 (2017)
110. Yang D., Oppenheim J.J. i wsp.: High-mobility group nucleosome-binding protein 1 acts as an alarmin and is critical for lipopolysaccharide-induced immune responses. *J. Exp. Med.* **209**, 157–171 (2012)
111. Yang D., Biragyn A., Hoover D.M., Lubkowski J., Oppenheim J.J.: Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 181–315 (2004)
112. Yang D., Bustin M., Oppenheim J.J.: Harnessing the alarmin HMGN1 for anticancer therapy. *Immunotherapy*, **7**, 1129–1131 (2015)
113. Yang D., Chen Q,. Schmidt A.P., Anderson G.M., Wang J.M., Wooters J., Oppenheim J.J., Chertov O.: LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1069–1074 (2000)
114. Yao Y.M., Redl H., Bahrami S., Schlag G.: The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm. Res.* **47**, 201–210 (1998)
115. Yendamuri S., Fulda G.J., Tinkoff G.H.: Admission hyperglycemia as a prognostic indicator in trauma. *J. Trauma*, **55**, 33–38 (2003)
116. Yoon K.W., Lee S.W. i wsp.: Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science*, **349**, 1261669 (2015)
117. Zhang Q., Itagaki K., Hauser C.J.: Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via P38 map kinase. *Shock*, **34**, 55–59 (2010)
118. Zhou J., Hodi F.S. i wsp.: Soluble PD- L1 as a biomarker in malignant melanoma and checkpoint blockade. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 480–492 (2017)
119. Zhou R., Tardivel A., Thorens B., Choi I., Tschopp J.: Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* **11**, 136–140 (2010)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 338–348
http://www.pm.microbiology.pl

DWA OBLICZA BAKTERII *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*, CZYLI OD KOMENSALA DO PATOGENU

Beata Podgórska[1, 2]*, Danuta Kędzia[2]

[1] Elbląska Uczelnia Humanistyczno-Ekonomiczna w Elblągu
[2] Zakład Mikrobiologii, Szpital Wojewódzki w Koszalinie

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w sierpniu 2018 r.

Streszczenie: Bakterie *Staphylococcus epidermidis* są mikroorganizmami komensalnymi, wchodzącymi w skład naturalnej mikrobioty skóry i błon śluzowych człowieka. Wykształciły szereg przystosowań, które umożliwiają kolonizację skóry i pozwalają im na unikanie mechanizmów obrony przeciwdrobnoustrojowej człowieka. Bakterie *S. epidermidis* konkurują z mikroorganizmami patogennymi. Wytwarzając czynniki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, wspomagają barierę ochronną skóry człowieka. Z drugiej strony są jednym z ważniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych. Szczepy szpitalne *S. epidermidis* wytwarzają biofilm i wykazują oporność na różne antybiotyki. Są odpowiedzialne głównie za zakażenia krwi oraz zakażenia związane z obecnością biomateriałów w organizmie pacjenta.

1. Wprowadzenie. 2. Bakterie *S. epidermidis* jako komensale. 2.1. Pochodzenie *S. epidermidis*. 2.2. Skóra jako środowisko życia *S. epidermidis*. 2.3. Mechanizmy adaptacyjne *S. epidermidis* do środowiska życia. 2.4. Mechanizmy wspierania bariery ochronnej skóry. 2.5. Wpływ na funkcje komórek gospodarza. 3. *S. epidermidis* jako patogen. 3.1. Biofilm bakteryjny i czynniki wirulencji. 4. Podsumowanie

FROM A COMMENSAL TO A PATHOGEN – TWO FACES OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Abstract: *Staphylococcus epidermidis* is a commensal organism and the most abundant constituent of the healthy human skin and mucous membrane microbiota. It is well adapted to colonize and evade human antimicrobial barriers. *Staphylococcus epidermidis* not only competes with potentially harmful pathogens, but also produces a plethora of proteins supporting host natural defenses. At the same time, *Staphylococcus epidermidis* is an opportunistic pathogen recognized as one of the leading causes of healthcare-associated infections. *Staphylococcus epidermidis* is mainly responsible for bloodstream infections and other biomedical device-related infections. Hospital strains of *Staphylococcus epidermidis* form protective biofilm and are characterized by their resistance to various antibiotics.

1. Introduction. 2. *Staphylococcus epidermidis* as a commensal organism. 2.1. Origin of *S. epidermidis*. 2.2. Human skin as *S. epidermidis* environment. 2.3. Adaptation mechanisms of *S. epidermidis*. 2.4. Mechanisms supporting skin's antimicrobial defences. 2.5. Impact on the activity of host cells. 3. *S. epidermidis* as a pathogen. 3.1. Bacterial biofilm and virulence factors. 4. Summary

Słowa kluczowe: bakterie komensalne, biofilm, *Staphylococcus epidermidis*
Keywords: commensal bacteria, biofilm, *Staphylococcus epidermidis*

1. Wprowadzenie

Bakterie *Staphylococcus epidermidis* są jednym z czołowych przedstawicieli mikrobioty skóry i błon śluzowych człowieka [20, 38, 67, 82]. Należą do grupy koagulazo-ujemnych gronkowców [5]. Komensalne bakterie *S. epidermidis* towarzyszą człowiekowi przez całe życie jako stali rezydenci skóry [37]. Aby utrzymać się na powierzchni skóry wykształciły szereg mechanizmów, które umożliwiają im wyczuwanie i obronę lub ominięcie odpowiedzi układu immunologicznego człowieka [49, 70].

Bakterie *S. epidermidis* aktywnie wspierają skórę w jej funkcjach bariery ochronnej i mechanizmy wrodzonej odporności człowieka. Wytwarzają szereg różnych czynników, które mają działanie przeciwdrobnoustrojowe, skierowane przeciw bakteriom patogennym [18, 43, 44]. Ostatnio pojawia się coraz więcej informacji na temat korzystnego wpływu bakterii komensalnych, w tym także *S. epidermidis* na zdrowie człowieka [13, 43, 66, 72, 81, 86].

Z drugiej strony w ostatnich latach *S. epidermidis* wyłonił się jako jeden z ważniejszych czynników etiologicznych zakażeń związanych z opieką medyczną HAI (Healthcare-Associated Infections) [95, 96]. Doprowadził do tego postęp medycyny i wprowadzenie inwazyjnych zabiegów diagnostycznych i leczniczych [79]. Patogeneza zakażeń wywoływanych przez szpitalne szczepy bakterii *S. epidermidis* wiąże się głównie z tworzeniem przez nie biofilmu na powierzchniach biomateriałów wprowadzanych do organizmu pacjenta. Bakterie *S. epidermidis* są wiodącym czynnikiem zakażeń krwi oraz zakażeń związanych z obecnością w organizmie człowieka biomateriałów [40, 62]. Wywołują zakażenia głównie u pacjentów z deficytami immunologicznymi, u pacjentów poddawanych terapii immunosupresyjnej, wcześniaków, pacjentów zakażonych wirusem HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), długotrwale hospitalizowanych i krytycznie chorych [28, 36]. Do głównych postaci klinicznych zakażeń wywoływanych przez *S. epidermidis* należą m.in. zakażenia łożyska naczyniowego [2], zakażenia implantów orto-

* Autor korespondencyjny: Beata Podgórska, Elbląska Uczelnia Humanistyczno-Ekonomiczna, ul. Lotnicza 2, 82-300 Elbląg; tel. 55 239 38 02; e-mail: pielegniarstwo@euh-e.edu.pl

pedycznych [65], infekcyjne zapalenie wsierdzia [17], czy zakażenia dróg moczowych związane obecnością cewnika moczowego [26].

Szpitalne szczepy bakterii gatunku *S. epidermidis* oprócz zdolności wytwarzania biofilmu wykształciły także oporność na różne antybiotyki. Większość izolatów szpitalnych (od 75 do 90%) wykazuje oporność na metycylinę MRSE (Methicillin Resistant *Staphylococcus epidermidis*) [96], a wraz z nią krzyżową oporność na większość antybiotyków β-laktamowych [5]. Około 85% z nich wykazuje także oporność na wiele innych antybiotyków MDRSE (Multidrug-Resistant *S. epidermidis*) [64, 96]. Szpitalne szczepy *S. epidermidis* stanowią w placówkach opieki medycznej rezerwuar genów oporności na antybiotyki, które mogą być przekazywane innym mikroorganizmom w tym środowisku [3]. Bakterie te rozprzestrzeniają się w szpitalach na całym świecie i stwarzają coraz większe zagrożenie [97].

Bakterie *S. epidermidis* nie posiadają klasycznych czynników wirulencji, takich jakie wytwarzają blisko z nimi spokrewnione *Staphylococcus aureus*, egzoenzymów degradacyjnych czy toksyn, których aktywność niszczy tkanki gospodarza (np. hemolizyn α i β, leukocydyny, toksyn eksfoliatywnych A i B) [23]. Większość czynników, które uczestniczą w patogenezie zakażeń wywoływanych przez *S. epidermidis* odgrywa ważną rolę także w ich komensalnym trybie życia. Może to wskazywać, że *S. epidermidis* nie jest mikroorganizmem typowo patogennym, a raczej patogenem oportunistycznym [69].

Celem artykułu jest przedstawienie czynników, które umożliwiają bakteriom *S. epidermidis* funkcjonowanie jako mikroorganizmu komensalnego, wspomagającego mechanizmy odporności wrodzonej człowieka oraz tych, które z drugiej strony czynią go jednym z ważniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych.

Udział bakterii *S. epidermidis* w wywoływaniu zakażeń szpitalnych, opis czynników, które mają wpływ na ich różnorodność klonalną oraz opis wytworzonych mechanizmów oporności na antybiotyki przedstawiono w artykule pt. „*Staphylococcus epidermidis* jako czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych", który opublikowano na stronie 348 bieżącego zeszytu *Postępów Mikrobiologii*.

2. Bakterie *S. epidermidis* jako komensale

2.1. Pochodzenie *S. epidermidis*

Jeszcze do niedawna panowało powszechne przekonanie, że płód oraz środowisko macicy jest jałowe, a pierwszy kontakt z bakteriami i kolonizacja noworodka następuje dopiero w chwili jego narodzin oraz w ciągu kilku dni po narodzinach [48]. Badania prowadzone w ramach programu Human Microbiome [75], który ma na celu określenie składu ludzkiej mikrobioty, jej roli w utrzymaniu zdrowia człowieka oraz wpływie na poszczególne jednostki chorobowe dały światło na całkiem nowe, dotychczas nieznane fakty. Ostatnie badania sugerują, że płód i płyn owodniowy nie są całkowicie sterylne, a pierwszy kontakt człowieka z *S. epidermidis* ma miejsce już podczas życia płodowego [19, 61]. Mogą na to wskazywać wyniki badań DNA (sekwencjonowanie fragmentu 16S rRNA) wyizolowanego z próbek krwi pępowinowej pobranej od dzieci narodzonych przez cesarskie cięcie [29], a także badania hodowlane, które umożliwiły wyizolowanie czystych kultur bakterii *S. epidermidis* (identyfikacja na podstawie sekwencjonowania fragmentu 16S rRNA) z próbek płynu owodniowego [19] oraz z mekonium czyli smółki (pierwszy kał), gdzie jak wykazano, bakterie *S. epidermidis* są najliczniej występującymi mikroorganizmami [45]. Z uwagi na duże zainteresowanie tym tematem zapewne możliwe będzie uzyskanie większej ilości danych i ostateczne wyjaśnienie tej kwestii w najbliższym czasie.

Badania eksperymentalne przeprowadzone na zwierzętach potwierdzają możliwość przenoszenia bakterii *S. epidermidis* z organizmu matki na płód [46]. Sugeruje się, że bakterie te mogą przedostawać się do środowiska macicy z jamy ustnej matki poprzez krwiobieg [25]. *S. epidermidis* jest jednym z pierwszych mikroorganizmów z jakimi ma kontakt płód, stąd uważa się, że może mieć wpływ na kształtowanie układu immunologicznego dziecka [81] i jego przygotowanie na zetknięcie ze znacznie większą liczbą różnorodnych drobnoustrojów podczas porodu oraz karmienia piersią [76].

Sposób narodzin ma ogromny wpływ na początkowy skład mikroorganizmów kolonizujących noworodka. Dzieci, które rodzą się, przez kanał rodny są kolonizowane głównie przez mikroorganizmy zasiedlające pochwę kobiety. Natomiast u dzieci przychodzących na świat przez cesarskie cięcie wykazano przewagę mikroorganizmów, które występują na skórze matki, w tym głównie bakterii z rodzaju *Staphylococcus* [29]. Ten początkowy skład mikroorganizmów u noworodka ma ogromny wpływ na tworzenie złożonych i stabilnych populacji mikroorganizmów, które mają wpływ na zdrowie w dorosłym życiu człowieka [6, 31, 61].

Tuż po porodzie i ekspozycji na środowisko organizm noworodka jest kolonizowany przez wiele różnych rodzajów mikroorganizmów. Ma to odzwierciedlenie w dużym zróżnicowaniu składu mikrobioty jelitowej noworodka [76]. Bakterie *Staphylococcus* spp. mogą przedostawać się do jelit niemowląt ze skóry matki, podczas karmienia piersią a także wraz z mlekiem matki, w którym stanowią dominującą grupę mikroorganizmów [46]. Jako fakultatywne beztlenowce, bakterie *S. epidermidis* (wraz z *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. i *Enterobacter* spp.) są pierwszymi i głównymi mikroorganizmami kolonizującymi

jelita niemowląt. Wykorzystując tlen i obniżając jego poziom w jelicie stwarzają warunki dla życia bakterii beztlenowych (*Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. i *Clostridium* spp.) [61].

Badania przeprowadzone przez Eggesbø [31] wykazały dynamikę składu ilościowego i jakościowego mikroorganizmów podczas życia osobniczego człowieka. Obserwowano stałe obniżanie liczby bakterii *Staphylococcus* spp. w jelitach dzieci począwszy od 4 do 120 dnia ich życia [31]. Skład mikrobioty jelit dzieci w wieku 3 lat jest istotnym czynnikiem wpływającym na stan ich zdrowia i neurorozwoju [9, 77]. Sugeruje się także, że znaczna przewaga liczebności bakterii *Staphylococcus* spp. w stosunku do *Bifidobacterium* spp. w jelitach dzieci może mieć wpływ także na ich na otyłość [47].

2.2. Skóra jako środowisko życia *S. epidermidis*

Ciało ludzkie jest środowiskiem życia wielu różnych rodzajów mikroorganizmów, które są niezbędne dla rozwoju i zdrowia człowieka. Bakterie *S. epidermidis* są podstawowym elementem mikrobioty skóry. Spełniają wiele ważnych funkcji i przyczyniają się do utrzymania homeostazy organizmu człowieka [18, 43, 81]. Należą do grupy stałych rezydentów i stanowią znaczącą część złożonej populacji mikroorganizmów na powierzchni skóry [37, 38, 67, 82]. Skóra człowieka jest bardzo zróżnicowanym środowiskiem. Skład i rozmieszczenie mikroorganizmów zależy od topografii i właściwości fizjologicznych, zajmowanej przez nie niszy [20, 37, 38, 67].

Bakterie *S. epidermidis* preferują miejsca wilgotne o wyższej temperaturze, dlatego występują głównie w zagłębieniach ciała: pod pachami, pod kolanami, w pachwinach, fałdzie pośladkowym, pomiędzy palcami, w okolicach pępka [37, 82]. Kolonizują także jamę nosową zdrowych osób (od 96 do 100%) [43]. Występują w obszarach łojowych, na czole pomiędzy brwiami, w zewnętrznym kanale słuchowym, na potylicy [38], ale także na obszarach odsłoniętych i suchych takich jak wewnętrzna strona przedramienia [82]. Jako fakultatywne beztlenowce bakterie *S. epidermidis* mogą występować zarówno na powierzchni skóry jak i w mieszkach włosowych, gdzie jest obniżona zawartość tlenu [82]. Poza skórą występują także na błonach śluzowych, np. gardła czy dróg rodnych [60, 84].

2.3. Mechanizmy adaptacyjne *S. epidermidis* do środowiska życia

Skóra stanowi barierę anatomiczną i wraz różnymi mechanizmami odporności wrodzonej (nieswoistej) chroni przed wnikaniem mikroorganizmów do wnętrza organizmu człowieka [8]. Jest wyjątkowo nieprzyjaznym środowiskiem życia dla bakterii. Kwaśny odczyn (pH ~5), niewystarczająca zawartość wolnej wody, duże wahania temperatury, ekspozycja na promieniowanie UV, wysokie stężenie soli (NaCl) pochodzącej z potu oraz obecność białek przeciwbakteryjnych AMP (Antimicrobial Peptides), wytwarzanych przez komórki skóry sprawiają, że tylko niektóre mikroorganizmy mają możliwość przetrwania i przebywania na stałe w tym środowisku [8]. Bakterie *S. epidermidis* należą do grupy stałych rezydentów i jako jedne z nielicznych mikroorganizmów są zdolne do stałego utrzymywania się przy życiu i odtwarzania swojej populacji w tych niesprzyjających warunkach [8]. Aby przetrwać wykształciły szereg przystosowań oraz stosują różne strategie, które umożliwiają im wyczuwanie i omijanie bądź przezwyciężanie fizycznych, chemicznych i biologicznych czynników obrony przeciwdrobnoustrojowej gospodarza [56].

Bakterie *S. epidermidis* są mikroorganizmami Gram-dodatnimi, tak wiec już sama struktura ściany komórkowej zbudowanej z wielu warstw mureiny nadaje im wysoką stabilność, dzięki czemu komórki bakterii są oporne na wysychanie, szok osmotyczny i czynniki mechaniczne [8]. Dodatkową warstwę ochronną dla komórek bakterii mogą tworzyć także białka, które znajdują się w środowisku ich występowania [41].

Aktywność gruczołów potowych sprawia, że środowisko ludzkiej skóry charakteryzuje się zmiennym, często wysokim stężeniem soli (NaCl). Bakterie *S. epidermidis* jako mikroorganizmy halotolerancyjne mogą przetrwać w środowiskach o bardzo wysokich stężeniach soli NaCl, sięgających nawet do 2 M [49]. Mechanizmy tej niezwykłej oporności wciąż nie są całkowicie poznane. Jednym z czynników, który ma na to wpływ jest wytwarzany przez nie egzopolimer, kwas poli-γ-DL-glutamowy PGA (Poly-γ-Glutamic *A*cid) [49]. PGA chroni bakterie nie tylko przed wysokim stężeniem NaCl, ale także przed białkami przeciwdrobnoustrojowymi AMP wytwarzanymi przez komórki skóry oraz przed fagocytozą przez neutrofile [49]. Bakterie *S. epidermidis* mają także zdolność gromadzenia w swoich komórkach osmoprotektantów: betainy glicynowej, proliny, jonów K^+, które zapobiegają ich odwodnieniu w środowisku o wysokiej osmolarności [10, 51]. Wysokie stężenia tych substancji wewnątrz komórek bakterii, nawet w warunkach braku stresu osmotycznego częściowo wyjaśniają ich niezwykłą tolerancję na NaCl i wysokie ciśnienie osmotyczne [51].

Z kolei do ograniczenia niekorzystnego wpływu kwaśnego odczynu skóry (pH 4,2–5,9), i jego neutralizacji przyczyniają się wytwarzane przez *S. epidermidis* enzymy, deiminaza argininowa oraz ureaza. Deiminaza argininowa to enzym, który jest zaangażowany w katabolizm argininy i jej konwersję do ornityny, amoniaku i dwutlenku węgla [27, 58]. Enzym ten jest kodowany przez geny zorganizowane w operonie *arc* (*arcA*, *arcB*, *arcC*, *arcD*), znajdującym się w obrębie

mobilnego elementu genetycznego ACME (Arginine Catabolic Mobile Element), który jest zlokalizowany w chromosomie i występuje u około 50% szczepów bakterii gatunku *S. epidermidis* [27, 63]. Wyczerpanie L-argininy jako substratu przez deiminazę argininową ma dodatkowo korzystne i ochronne znaczenie dla bakterii *S. epidermidis,* ponieważ jest ona także substratem do produkcji tlenku azotu (NO). Związek ten ma działanie bakteriobójcze i jest elementem zarówno wrodzonej jak i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko mikroorganizmom [27]. Innym czynnikiem umożliwiającym przeciwdziałaniu stresowi kwasowemu jest wytwarzana przez *S. epidermidis* ureaza. Enzym ten katalizuje rozkład mocznika, który jest składnikiem potu, a jednym z produktów tej reakcji jest amoniak [88].

Ochronne działanie przed kwaśnym odczynem skóry ma także biofilm bakteryjny tworzony przez niektóre szczepy bakterii *S. epidermidis* [58, 88].

Skóra ludzka nie stanowi jedynie pasywnej, mechanicznej bariery, lecz także aktywnie uczestniczy w obronie przed mikroorganizmami. Komórki skóry wytwarzają białka AMP o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Te małe białka o długości 5–149 aminokwasów charakteryzują się szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Głównym celem ich ataku jest ściana lub błona komórkowa bakterii [34]. Są one cząsteczkami efektorowymi nieswoistej odpowiedzi immunologicznej i stanowią pierwszą linię obrony u człowieka. Chronią go przed patogenami, ale także kontrolują skład naturalnej mikrobioty, często wykazując z nią działanie synergistyczne [34]. Głównymi rodzinami białek AMP wytwarzanymi w skórze człowieka są: katelicydyny, β-defensyny i dermicydyny [34, 54]. Są one produkowane przez keratynocyty, komórki tuczne, neutrofile, sebocyty a także występują w pocie [34, 35].

Defensyny i katelicydyny są białkami o ładunku dodatnim. Jest to podyktowane przewagą obecności aminokwasów zasadowych, głównie argininy i lizyny. Kationowy charakter tych białek AMP ułatwia ich wiązanie z ujemnie naładowanymi składnikami ściany komórkowej bakterii, np. lipopolisacharydem LPS (Lipopolysaccharide), kwasami teichojowymi TA (Teichoic Acid), odpowiednio na powierzchni komórek bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich oraz z ujemnie naładowanymi fosfolipidami błony komórkowej bakterii. Kationowe białka AMP początkowo są przyciągane do powierzchni komórki bakterii przez oddziaływania elektrostatyczne, a następnie wbudowane w strukturę jej błony komórkowej. Prowadzi to do uszkodzenia błony komórkowej, wypłynięcia zawartości komórki bakterii, a ostatecznie do jej śmierci [1, 34].

Ochronę przed aktywnością kationowych białek AMP bakterie *S. epidermidis* zawdzięczają sprawnie działającemu w ich komórkach systemowi Aps [70]. System ten składa się z układu czujnik / regulator. Elementem czujnikowym jest białko ApsS, które oddziałując z białkiem AMP aktywuje mechanizmy regulacji. Mechanizmy te obejmują indukcję ekspresji genów operonu *dlt* i genu *mprF*, co prowadzi odpowiednio do D-alanylacji kwasów teichojowych oraz włączenia lizylo-fosfatydyloglicerolu do błony cytoplazmatycznej bakterii [56, 70]. Ta modyfikacja kwasów teichojowych i błony cytoplazmatycznej dodatnio naładowanymi cząsteczkami zmienia ładunek powierzchniowy komórek bakterii i ostatecznie prowadzi do elektrostatycznego odpychania kationowych białek AMP [56]. W skład systemu Aps wchodzi także transporter (pompa) VraFG, którego działanie polega na usuwaniu białek AMP z błony cytoplazmatycznej na zewnątrz komórki bakterii albo ich importowanie do wnętrza komórki w celu inaktywacji proteolitycznej [56, 70].

Z kolei przed bakteriobójczą aktywnością białek AMP o charakterze anionowym, m.in. dermicydyną, komórki bakterii *S. epidermidis* są chronione przez aktywność wydzielanych zewnątrzkomórkowo enzymów degradacyjnych, m.in. proteazy SepA [15, 54]. Dodatkowo rolę ochronną pełnią także wytwarzane przez bakterie egzopolimery: kwas poli-γ-DL-glutamowy PNAG [49] i polisacharyd PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin). PIA jest adhezyną i kationowym polimerem N-acetyloglukozaminy, który jest syntetyzowany przez szczepy bakterii wytwarzające biofilm [100]. Rola ochronna tych egzopolimrów polega na osłonięciu komórek bakterii i ich odizolowaniu od negatywnego wpływu białek AMP [49, 90].

2.4. Mechanizmy wspierania bariery ochronnej skóry

Bakterie *S. epidermidis* jako mikroorganizmy komensalne, stale przebywające na skórze aktywnie wspierają mechanizmy obronne człowieka, co może nawet sugerować ich mutualistyczny związek z gospodarzem. Odbywa się to między innymi przez wytwarzanie przez bakterie własnych czynników, które mają właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Mechanizm ten umożliwia bakteriom *S. epidermidis* konkurowanie o niszę z innymi mikroorganizmami i nie zezwala na kolonizację skóry przez bakterie patogenne [18].

Do grupy białek o aktywności przeciwbakteryjnej wytwarzanych przez *S. epidermidis* należą moduliny rozpuszczalne w fenolu PSM (Phenol-Soluble Modulin). Te małe białka, o długości 20–44 aminokwasów wykazują działanie synergistyczne z białkami AMP gospodarza [18, 74]. PSM są toksynami, które selektywnie uszkadzają błonę komórkową bakterii patogennych, między innymi *S. aureus*, w tym także szczepów metycylinooopornych MRSA (Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus), *Streptococcus g*rupy A (*Streptococcus pyogenes*) oraz bakterii *Escherichia coli* [18].

Ich selektywna aktywność w stosunku do komórek bakterii patogennych sprawia, że toksyny PSM nie naruszają struktury mikrobioty skóry, w tym także nie uszkadzają komórek wytwarzających je bakterii *S. epidermidis* [18]. Jest to możliwe dzięki funkcjonującemu u *S. epidermidis* systemowi sekrecji, którego kluczowym elementem jest białko transportowe Pmt, umożliwiające eksport toksyn PSM z wnętrza wytwarzających je komórek bakterii do otaczającego środowiska [14].

Białka PSM wspierają system obronny gospodarza i spełniają istotną rolę w komensalnym stylu życia bakterii *S. epidermidis* ułatwiając im wzrost i rozprzestrzenianie się na powierzchni naskórka [14, 18]. Jednak kiedy skóra jest uszkodzona a bakterie wnikają w głąb tkanek gospodarza mogą wykazywać w stosunku do nich także działanie toksyczne. Z uwagi na to są zaliczane do czynników wirulencji bakterii *S. epidermidis* (rozdział 3.1). Białka PSM spełniają także istotną rolę w procesach dojrzewania biofilmu (rozdział 3.1).

Większość szczepów *S. epidermidis* (96%) produkuje bakteriocyny, które są białkami skierowanymi przeciwko innym gatunkom lub szczepom bakterii blisko z nimi spokrewnionych. Szczepy *S. epidermidis* wytwarzające bakteriocyny same nie podlegają ich szkodliwemu działaniu [35, 44]. Większość bakteriocyn wytwarzanych przez *S. epidermidis* należy do grupy lantybiotyków, np.: epidermina, epilancyna K7, Pep5, gallidermina [7], epilancyna 15X [32], stafylokokcyna 1580 [4] epidermicyna N101 [80], epicydyna 280 [4] i bakteriocyn klasy II, np.: aureocyny A70 i 53 [4].

Lantybiotyki są antybakteryjnymi peptydami zawierającymi tioeterowe aminokwasy lantioninę i/lub metyllantioninę. Ich działanie bakteriobójcze polega głównie na tworzeniu porów w błonach komórkowych bakterii [7].

Wytwarzane przez *S. epidermidis* bakteriocyny hamują wzrost wielu bakterii patogennych, w tym także *S. aureus* [44]. Ze względu na wielki potencjał przeciwbakteryjny bakteriocyn ostatnio pokłada się wielkie nadzieje na ich wykorzystanie jako środków zapobiegających zakażeniom oportunistycznym u pacjentów z deficytami układu odpornościowego [44].

Innym mechanizmem antagonistycznego oddziaływania *S. epidermidis* w stosunku do patogennych bakterii *S. aureus* jest wytwarzanie przez nie egzoenzymu, proteazy serynowej Esp. Proteaza Esp hydrolizuje szereg białek kluczowych dla powstawania biofilmu, m.in. odpowiedzialnych za adhezję oraz interakcje gospodarz-patogen, w tym także białko A bakterii *S. aureus*. Degraduje także białka macierzy zewnątrzkomórkowej człowieka, do których wiążą się komórki bakterii *S. aureus* (m.in. fibronektynę, fibrynogen, witronektynę) [43, 85]. Z uwagi na to proteaza Esp jest zaliczana także do czynników wirulencji *S. epidermidis* [69]. Proteaza Esp nie tylko hamuje powstawanie biofilmu, wytwarzanego przez *S. aureus*, ale może także degradować biofilm który już istnieje [43, 85]. W organizmie człowieka głównym rezerwuarem *S. aureus* jest jama nosowa. Około jedna trzecia populacji ludzkiej jest nosicielem tych patogennych bakterii. Kolonizacja nozdrzy jest jednym z głównych czynników ryzyka zakażeń szpitalnych wywoływanych przez *S. aureus* (m.in. zakażeń skóry, zakażeń łożyska naczyniowego, infekcyjnego zapalenia wsierdzia, zakażeń tkanek miękkich). Obecność komensalnych bakterii *S. epidermidis* w jamie nosowej zapobiega jej kolonizacji przez mikroorganizmy patogenne [43, 85]. Badania eksperymentalne przeprowadzone na myszach wykazały, że donosowa aplikacja bakterii *S. epidermidis* zapobiega także kolonizacji przez szczepy MRSA [73].

Bakterie *S. epidermidis* mogą hamować wytwarzanie biofilmu przez *S. aureus* także poprzez blokowanie systemu *quorum sensing* tych bakterii. System ten oprócz wpływu na tworzenie biofilmu kontroluje także ekspresję innych ważnych czynników wirulencji *S. aureus*, np. toksyn α, β, δ, proteazy serynowej, DN-azy, fibrynolizyny, enterotoksyny B, toksyny zespołu wstrząsu toksycznego TSST1 [55].

Ostatnie badania sugerują, że bakterie *S. epidermidis* kolonizujące jamę nosową człowieka mogą zapobiegać także infekcjom wirusowym. Jest to możliwe dzięki obecności w komórkach bakterii białka Embp, które jak wykazano wiąże wirusy grypy i przez to działa jak filtr ochronny [13].

Bakterie *S. epidermidis* przyczyniają się także do wytwarzania wolnych kwasów tłuszczowych FFA (Free Fatty Acids), które na powierzchni skóry tworzą barierę przeciwbakteryjną. FFA na powierzchni skóry są wytwarzane przez sebocyty, ale w dużym stopniu także poprzez aktywność lipolityczną komensalnych bakterii *S. epidermidis* oraz bakterii *Propionibacterium acnes* [35]. Bakteryjne lipazy hydrolizują trójglicerydy sebum produkowanego przez gruczoły łojowe, a produktem tej reakcji są wolne kwasy tłuszczowe. Niektóre średnio- i długołańcuchowe FFA (C8-C18) wykazują działanie przeciw szerokiemu spektrum bakterii Gram-dodatnich i stanowią ważny element odporności wrodzonej człowieka [30]. Bakterie *S. epidermidis* unikają bakteriobójczej aktywności FFA przez ich modyfikację enzymatyczną. Umożliwia to wytwarzany przez bakterie enzym FAME (Fatty Acid Modifying Enzyme), który katalizuje reakcję estryfikacji kwasów tłuszczowych [12].

2.5. Wpływ na funkcje komórek gospodarza

Bakterie *S. epidermidis* mogą korzystnie wpływać na funkcjonowanie skóry jako bariery ochronnej także poprzez wpływ na funkcje komórek gospodarza.

Kwas lipoteichojowy obecny w ścianie komórkowej bakterii *S. epidermidis* może hamować nadmierną odpowiedź zapalną keranocytów oraz uwalnianie cytokin prozapalnych podczas uszkodzenia skóry, co w tym przypadku działa na niekorzyść, ponieważ znacznie opóźnia gojenie rany [53].

Bakterie *S. epidermidis* mogą pobudzać keranocyty do produkcji białek AMP (m.in. β-defensyn), lub hamować ich wytwarzanie. Aktywacja keranocytów przyczynia się do wzmożonego wytwarzania białek AMP i przygotowania gospodarza do odparcia ataku bakterii patogennych [52]. Z kolei hamowanie ich aktywności pozwala bakteriom uniknąć bakteriobójczego działania białek AMP [15, 42]. Utrzymanie równowagi pomiędzy stymulacją a unikaniem przez bakterie *S. epidermidis* wrodzonej odpowiedzi immunologicznej ma ogromne znaczenie dla zachowania homeostazy i zdrowia człowieka.

Najnowsze badania wskazują na kolejną bardzo ważną, ochronną rolę jaką mogą spełniać bakterie *S. epidermidis* w organizmie człowieka. Nakatsuji i wsp. [66] wykazali, że niektóre szczepy bakterii *S. epidermidis*, zdolne do wytwarzania 6-N-hydroksyaminopuryny (6-HAP), mają wybiórczą zdolność hamowania wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych (głównie nowotworów skóry wywołanych przez promieniowanie UV). Potwierdziły to badania eksperymentalne przeprowadzone na myszach [66]. 6-HAP jest cząsteczką, która hamuje replikację kwasu DNA, a mechanizm działania polega prawdopodobnie, na konkurowaniu cząsteczki 6-HAP z adeniną.

3. *S. epidermidis* jako patogen

3.1. Biofilm bakteryjny i czynniki wirulencji

Kluczowe znaczenie w patogenezie zakażeń wywoływanych przez *S. epidermidis* ma biofilm, który jest tworzony przez niektóre szczepy tych bakterii. Około połowa wszystkich zakażeń HAI ma związek z obecnością biofilmu wytwarzanego przez bakterie na powierzchniach biomateriałów wprowadzonych do organizmu pacjenta [68, 98].

Bakterie *S. epidermidis* wiążą się preferencyjnie do powierzchni biomateriałów wprowadzanych do organizmu pacjenta [39]. We wstępnej fazie interakcji komórek bakterii i powierzchni abiotycznych główne znaczenie odgrywają oddziaływania fizyczne, m.in.: ruchy Browna, siły przyciągania van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne oraz siły hydrofobowe. Ten początkowy etap wiązania komórek bakterii jest odwracalny [69].

Powierzchnie wprowadzonych do organizmu pacjenta biomateriałów (m.in.: cewników naczyniowych, cewników urologicznych, implantów ortopedycznych, sztucznych zastawek serca itp.) pokrywają się białkami osocza i białkami macierzy zewnątrzkomórkowej: albuminą, fibronektyną, fibrynogenem, kolagenem, witronektyną, elastyną, lamininą. Białka te są rozpoznawane przez adhezyny, które są zakotwiczone w ścianie komórkowej bakterii [69]. Adhezyny umożliwiają nieodwracalnie wiązanie komórek bakterii do powierzchni biomatriałów w dalszym etapie tworzenia biofilmu. W zjawisku tym u *S. epidermidis* uczestniczą głównie białka powierzchniowe AtlE, białko Bap/Bhp [69], grupa białek adhezyjnych MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) oraz kwasy teichojowe [91]. W początkowym etapie tworzenia biofilmu aktywność białka AtlE, które spełnia podwójną funkcję zarówno adhezyny jak i autolizyny, prowadzi do lizy małej subpopulacji komórek bakterii *S. epidermidis* i uwolnienia z nich kwasu DNA. Ta uwolniona frakcja zewnątrzkomórkowego DNA (extracellular DNA) inicjuje wiązanie komórek bakterii do powierzchni biomateriałów, a także wiązanie komórek pomiędzy sobą [94]. Wytwarzany przez *S. epidermidis* biofilm jest strukturą złożoną. Składa się z wielu warstw komórek bakterii, które są stabilizowane przez zewnątrzkomórkowe DNA bakterii, białka adhezyjne i wytwarzane przez bakterie egzopolimery PIA i kwas poli-γ-DL-glutamowy PGA [49, 69]. Egzopolisacharyd PIA (inaczej zwany PNAG) jest polimerem N-acetyloglukozaminy. Enzymy, które biorą udział w jego syntezie są kodowane przez geny zorganizowane w operonie *ica* (intercellular adhesion) (*icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*) [99]. Około 87% szpitalnych szczepów bakterii gatunku *S. epidermidis*, które posiadają geny *ica* wytwarza biofilm bakteryjny, stąd ich obecność uznaje się za jeden z głównych markerów patogenności tych bakterii [100]. W niektórych szczepach *S. epidermidis* funkcje egzopolisacharydu PIA przejmują białka powierzchniowe, głównie Bap/Bhp [87], Aap [78] i Embp [16].

Formowanie i dojrzewanie biofilmu u *S. epidermidis* kontrolowane jest przez system *quorum sensing* i geny *agr* (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*) [55]. Z uformowanego, dojrzałego biofilmu mogą odrywać się jego fragmenty. Te uwolnione fragmenty biofilmu mogą przemieszczać się w organizmie pacjenta i przyczyniać się do rozprzestrzeniania się bakterii, powstawania wtórnych ognisk zakażenia, bądź nawrotów infekcji [68]. Ten etap rozwoju biofilmu wspierają produkowane przez bakterie egzoproteazy Esp, które degradują białka znajdujące się na powierzchni biofilmu, oraz białka PSM (głównie PSMβ), które ułatwiają rozrywanie wiązań niekowalencyjnych w biofilmie [92]. Białka PSM uczestniczą także w tworzeniu kanałów wewnątrz biofilmu, które umożliwiają dystrybucję składników odżywczych do wszystkich jego warstw i ułatwiają ich dostępność dla bakterii [74, 92]. Tworzenie przez bakterie biofilmu jest strategią umożliwiającą im przetrwanie

i przystosowanie się do środowiska życia [98]. Zewnątrzkomórkowa macierz biofilmu, utworzona przez egzopolimery PIA i PGA [49, 69], zapewnia bakteriom ochronę przed dostępem antybiotyków [11], przed aktywnością białek AMP, wytwarzanych przez komórki gospodarza [90] oraz przed działaniem wrodzonego układu odpornościowego człowieka [50, 90]. Leczenie zakażeń, związanych z tworzeniem przez bakterie biofilmu jest skomplikowane i stanowi duże wyzwanie dla dzisiejszej medycyny [33].

Poza biofilmem do czynników wirulencji bakterii *S. epidermidis* należą wytwarzane przez nie toksyny, wśród nich głównie białka PSM (moduliny rozpuszczalne w fenolu). Białka PSM spełniają ważną rolę w komensalnym stylu życia bakterii (rozdz. 2.4), równocześnie stanowią ważny czynnik ich wirulencji [74]. Aktywność białek PSM w patogenezie zakażeń wywoływanych przez *S. epidermidis* ma wiele aspektów. Jednym z nich jest udział w dojrzewaniu i rozprzestrzenianiu biofilmu bakteryjnego [74, 92], innym jest ich aktywność cytolityczna oraz prozapalna. Najsilniejszą aktywność cytolityczną spośród wszystkich typów modulin syntetyzowanych przez *S. epidermidis*, wykazuje białko PSMδ, nazywane toksyną δ lub hemolizyną δ [14, 91]. Białko PSMδ jest wytwarzane przez większość szczepów bakterii *S. epidermidis* (95%) [76]. Ekspresja genu kodującego toksynę δ jest regulowana przez system *quorum sensing* i czynnik regulatorowy Agr [93]. Toksyna wykazuje aktywność cytolityczną zarówno w stosunku do komórek prokariotycznych jak i eukariotycznych. Powoduje między innymi uszkodzenie neutrofili oraz hemolizę erytrocytów [15]. Może również silnie uszkadzać tkanki gospodarza. Odnotowano przypadki martwiczego zapalenia jelit u noworodków wywołane aktywnością toksyny PSMδ [71, 83]. Toksyny PSM mogą także wywierać działanie prozapalne poprzez aktywację neutrofilów i uwalnianie cytokin prozapalnych [15]. Białka PSM produkowane przez *S. epidermidis* mają jednak znacznie słabsze działanie toksyczne i nie są tak destrukcyjne jak te, które są syntetyzowane przez *S. aureus* [15, 23].

Istnieją nieliczne doniesienia o wytwarzaniu przez szpitalne szczepy bakterii *S. epidermidis*, innych toksyn, np. enterotoksyn, głównie SEC3 (Staphylococcal Enterotoxin C3) i SElL (Staphylococcal Enterotoxin-Like toxin L) [59, 76], czy toksyny zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1) [24, 57]. Zarówno enterotoksyny jak i toksyna TSST-1 są superantygenami. Pobudzają układ odpornościowy do nadmiernej odpowiedzi immunologicznej. Powodują wzrost proliferacji limfocytów oraz uwalnianie cytokin prozapalnych, co prowadzi do zaostrzenia objawów infekcji i wstrząsu toksycznego TSS (Toxic Shock Syndrome) [23, 89].

Enterotoksyny są produkowane głównie przez koagulazo-dodatnie bakterie *S. aureus* [23]. Są małymi, termostabilnymi białkami odpowiedzialnymi przeważnie za wywoływane przez te bakterie zatrucia pokarmowe [22].

Enterotoksyny SEC3 i SElL produkowane przez *S. epidermidis* są kodowane przez geny znajdujące się w obrębie wysp patogenności SePI (*S. epidermidis* Pathogenicity Island) zlokalizowanych w chromosomie bakterii. Wyspa patogenności SePI jest mobilnym elementem genetycznym. Jej obecność wykryto dotychczas w jednym klinicznym szczepie *S. epidermidis* [59].

Obecność enterotoksyn oraz toksyny TSST-1, wytwarzanych przez bakterie *S. epidermidis* wykrywano głównie u pacjentów z bakteriemią, u których wystąpił syndrom szoku toksycznego [21, 76].

4. Podsumowanie

Bakterie *S. epidermidis* są dominującym elementem mikrobioty skóry i błon śluzowych człowieka. Kolonizacja skóry przez *S. epidermidis* odgrywa ważną rolę w utrzymaniu homeostazy i zdrowia człowieka.

Bakterie *S. epidermidis* wykształciły różne strategie umożliwiające im przystosowanie się do środowiska życia, jakim jest skóra człowieka i unikania wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.

Dzięki syntetyzowanym czynnikom antybakteryjnym *S. epidermidis* aktywnie wspierają układ immunologiczny człowieka.

Głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za patogenność szpitalnych szczepów bakterii *S. epidermidis* jest wytwarzany przez nie biofilm oraz oporność na antybiotyki.

Piśmiennictwo

1. Agarwal S., Sharma G., Dang S., Gupta S., Gabrani R.: Antimicrobial peptides as anti-infectives against *Staphylococcus epidermidis*. *Med. Princ. Pract.* **25**, 301–308 (2016)
2. Asaad A.M., Qureshib M.A., Hasanc S.M.: Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolates from nosocomial bloodstream infections. *Infect. Dis.* **48**, 356–360 (2016)
3. Barbier F., Ruimy R. i wsp.: Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCC*mec* IV between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **15**, 270–281 (2010)
4. Bastos M.C., Ceotto H., Coelho M.L., Nascimento J.S.: Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 38–61 (2009)
5. Becker K., Heilmann C., Peters G.: Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014)
6. Biasucci G., Benenati B., Morelli L., Bessi E., Boehm G.: Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J. Nutr.* **138**, 1796–1800 (2008)
7. Bierbaum G., Gotz F., Peschel A., Kupke T., van de Kamp M., Sahl H.G.: The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, galli-

dermin, Pep5 and epilancin K7. *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**, 119–127 (1996)
8. Bojar R.A., Holland K.T.: Review: the human cutaneous microflora and factors controlling colonisation. *World J. Microb. Biot.* **18**, 889–903 (2002)
9. Borre Y.E., Moloney R.D., Clarke G., Dinan T.G., Cryan J.F.: The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms & therapeutic potential. *Adv. Exp. Med. Biol.* **817**, 373–403 (2014)
10. Cayley S., Lewis B.A., Record M.T.: Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**, 1586–1595 (1992)
11. Cerca N., Jefferson K.K., Oliveira R., Pier G.B., Azeredo J.: Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm orinthe planktonic state. *Infect. Immun.* **74**, 4849–4855 (2006)
12. Chamberlain N.R., Brueggemann S.A.: Characterisation and expression of fatty acid modifying enzyme produced by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* **46**, 693–697 (1997)
13. Chen H.W., Liu P.F., Liu Y.T., Kuo S., Zhang X.Q., Schooley R.T., Rohde H., Gallo R.L., Huang C.M.: Nasal commensal *Staphylococcus epidermidis* counteracts influenza virus. *Sci. Rep.* **6**, 278–279 (2016)
14. Cheung G.Y.C., Joo H.-S., Chatterjee S.S., Otto M.: Phenol--soluble modulins – critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev*. **38**, 698–719 (2014)
15. Cheung G.Y., Rigby K., Wang R., Queck S.Y., Braughton K.R., Whitney A.R., Teintze M., DeLeo F.R., Otto M.: *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *Plos Pathog.* **6**, e1001133 (2010)
16. Christner, M., Rohde i wsp.: The giant extracellular matrix--binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol. Microbiol.* **75**, 187–207 (2010)
17. Chu V.H., Fowler V.G.J. i wsp.: Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 232–242 (2008)
18. Cogen A.L., Gallo R.L. i wsp.: Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 192–200 (2010)
19. Collado M.C., Rautava S., Aakko J., Isolauri E., Salminen S.: Human gut colonisation may be initiated *in utero* by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*, **6**, DOI: 10.1038/srep23129 (2016)
20. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R.: Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, **326**, 1694–1697 (2009)
21. Crass B.A., Bergdoll M.S.: Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 43–45 (1986)
22. Cretenet M., Even S., Le Loir Y.: Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci. Technol.* **91**, 127–150 (2011)
23. Cunha M.L., Calsolari R.A.O.: Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol. Insights*, **1**, 13–24 (2008)
24. Cunha M.L., Calsolari R.A.O., Araújo Jr.J.P.: Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microb. Immun.* **51**, 381–390 (2007)
25. Dasanayake A.P., Li Y., Wiener H., Ruby J.D., Lee M.J.: Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *J. Periodontol.* **76**, 171–177 (2005)
26. De N., Godlove M.: Prevalence of *S. aureus* and *S. epidermidis* among patients with indwelling catheters and their antibiogram using some commonly used antibiotics. *J. Am. Sci.* **6**, 515–520 (2010)
27. Diep B.A., Perdreau-Remington F. i wsp.: Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **367**, 731–739 (2006)
28. Domingo P., Fontanet A.: Management of complications associated with totally implantable ports in patients with AIDS. *AIDS Patient Care STDS*, **15**: 7–13 (2001)
29. Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R.: Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 11971–11975 (2010)
30. Drake D.R., Brogden K.A., Dawson D.V., Wertz P.W.: Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J. Lipid Res.* **49**, DOI: 10.1194/jlr.R700016-JLR200 (2008)
31. Eggesbø M., Moen B., Peddada S., Baird D., Rugtveit J., Midtvedt T., Bushel P.R., Sekelja M., Rudi K.: Development of gut microbiota in infants not exposed to medical interventions. *APMIS*, **119**, DOI: 10.1111/j.1600-0463.2010.02688.x (2011)
32. Ekkelenkamp M.B., Hanssen M., Danny Hsu S.T., de Jong A., Milatovic D., Verhoef, J., van Nuland N.A.: Isolation and structural characterization of epilancin 15X, a novel lantibiotic from a clinical strain of *Staphylococcus epidermidis*. *FEBS Lett.* **579**, 1917–1922 (2005)
33. Franca A., Carvalhais V., Vilanova M., Pier G.B., Cerca N.: Characterization of an *in vitro* fed-batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms. *AMB Express*, **6**, DOI: 10.1186/s13568-016-0197-9 (2016)
34. Gallo R.L., Hooper L.V.: Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 503–516 (2013)
35. Gallo R.L., Nakatsuji T.: Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1974–1980 (2011)
36. Ghassemi A., Farhangi H., Badiee Z., Banihashem A., Mosaddegh M.R.: Evaluation of nosocomial infection in patients at hematology-oncology ward of Dr. Sheikh children's hospital. *Iran. J. Ped. Hematol. Oncol.* **5**, 179–185 (2015)
37. Grice E.A., Segre J.A.: The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 244–253 (2011)
38. Grice E.A., Segre J.A. i wsp.: Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, **29**, 1190–1192 (2009)
39. Gristina A.: Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science,* **237**, 1588–1595 (1987)
40. Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., Horan T.C., Sievert D.M., Pollock D.A., Fridkin S.K.: Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 996–1011 (2008)
41. Hirai Y.: Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *J. Hosp. Infect.* 19, 191–200 (1991)
42. Holland D.B., Bojar R.A., Farrar M.D., Holland K.T.: Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **290**, 149–155 (2009)
43. Iwase T., Uehara Y., Shinji H., Tajima A., Seo H., Takada K., Agata T., Mizunoe Y.: *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, **465**, 346–349 (2010)
44. Janek D., Zipperer A., Kulik A., Krismer B., Peschel A.: High frequency and diversity of antimicrobial activities produced by

nasal *Staphylococcus* strains against bacterial competitors. *Plos Pathog.* **12**, e1005812 (2016)
45. Jiménez E., Marin M.L., Martin R., Odriozola J.M., Olivares M., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M.: Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* **159**, 187–193 (2008a)
46. Jimenez E., Delgado S., Maldonado A., Arroyo R., Albujar M., Garcia N., Jariod M., Fernandez L., Gomez A., Rodriguez J.M.: *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol.* **8**, DOI: 10.1186/1471-2180-8-143 (2008b)
47. Kalliomäki M., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E.: Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 534–538 (2008)
48. Keyworth, N., Millar, M.R, Holland, K.T.: Development of cutaneous microflora in premature neonates. *Arch. Dis. Child.* **67**, 797–801 (1992)
49. Kocianova S., Vuong C., Yao Y., Voyich J.M., Fischer E.R., DeLeo F.R., Otto M.: Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Invest*. **115**, 688–694 (2005)
50. Kristian S., Birkenstock T., Sauder U., Mack D., Gotz F., Landmann R.: Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J. Infect. Dis*. **197**, 1028–1035 (2008)
51. Kunin C.M., Rudy J.: Effect of NaCl-induced osmotic stress on intracellular concentrations of glycine betaine and potassium in Escherichia coli, Enterococcus faecalis, and staphylococci. *J. Lab. Clin. Med*. **118**, 217–224 (1991)
52. Lai Y., Cogen A.L., Radek K.A., Park H.J., Macleod D.T., Leichtle A., Ryan A.F., Di Nardo A., Gallo R.L.: Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2211–2221 (2010)
53. Lai Y., Gallo R.L. i wsp.: Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat Med.* **15**, 1377–1382 (2009)
54. Lai Y., Villaruz A.E., Li M., Cha D.J., Sturdevant D.E., Otto M.: The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol. Microbiol.* **63**, 497–506 (2007)
55. Le K.Y., Otto M.: Quorum-sensing regulation in staphylococci – an overview. *Front. Microbiol.* **6**, DOI: 10.3389/fmicb.2015.01174 (2015)
56. Li M., Lai Y., Villaruz A.E., Cha D.J., Sturdevant D.E., Otto M.: Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9469–9474 (2007)
57. Lina G., Fleer A., Etienne J., Greenland T.B., Vandenesch F.: Coagulase-negative staphylococci isolated from two cases of toxic shock syndrome lack superantigenic activity, but induce cytokine production. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 81–86 (1996)
58. Lindgren J.K., Fey P.D. i wsp.: Arginine deiminase in *Staphylococcus epidermidis* functions to augment biofilm maturation through pH homeostasis. *J. Bacteriol.* **196**, 2277–2289 (2014)
59. Madhusoodanan J., Gill, S.R. i wsp.: An enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **193**, 1854–1862 (2011)
60. Majchrzak K., Mierzwińska-Nastalska E., Chmura A., Kwiatkowski A., Paczek L., Młynarczyk G., Szymanek-Majchrzak K.: Comparison of staphylococcal flora in denture plaque and the surface of the pharyngeal mucous membrane in kidney transplant recipients. *Transplant. Proc.* **48**, 1590–1597 (2016)
61. Martin R., Knol J.: Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *Plos One*, **11**, e0158498 (2016)
62. McCann M.T., Gilmore B.F., Gorman S.P.: *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm. Pharmacol.* **60**, 1551–1571 (2008)
63. Miragaia M., Diep B.A. i wsp.: Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. *Plos One,* **6**, e7722 (2009)
64. Miragaia M., Thomas J.C., Couto I., Enright M.C., de Lencastre H.: Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* **189**, 2540 –2552 (2007)
65. Montanaro L., Speziale P., Campoccia D., Ravaioli S., Cangini I., Pietrocola G., Giannini S., Arciola C.: Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* **6**, 1329–1349 (2011)
66. Nakatsuji T., Gallo R.L. i wsp.: A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. *Sci. Adv.* **4**, DOI: 10.1126/sciadv.aao4502 (2018)
67. Oh J., Byrd A.L., Deming C., Conlan S., NISC Comparative Sequencing Program, Kong H.H., Segre J.A.: Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*, **514**, 59–64 (2014)
68. Otto M.: Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med*. **64**, 175–188 (2013)
69. Otto M.: *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 555–567 (2009a)
70. Otto M.: Bacterial sensing of antimicrobial peptides. *Contrib. Microbiol*. **16**, 136–149 (2009b)
71. Overturf G.D., Sherman M.P., Scheifele D.W., Wong L.C.: Neonatal necrotizing enterocolitis associated with delta toxin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**, 88–91 (1990)
72. Park Y.J., Lee H.K.: The role of skin and orogenital microbiota in protective immunity and chronic immune-mediated inflammatory disease. *Front. Immunol.* **10**, DOI: 10.3389/fimmu.2017 (2018)
73. Park B., Iwase T., Liu G.Y.: Intranasal application of *S. epidermidis* prevents colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice. *Plos One*, **6**, e25880 (2011)
74. Peschel A., Otto M.: Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat. Rev. Microbiol*. **11**, 667–673 (2013)
75. Peterson, J., S., Guyer M. i wsp.: The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323 (2009)
76. Pinheiro L., Brito C.I., de Oliveira A., Martins P.Y., Pereira V.C., da Cunha M.L.: *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. *Toxins,* **7**, 3688–3699 (2015)
77. Rodríguez J.M., Collado M.C. i wsp.: The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health Dis*. **2**, DOI: 10.3402/mehd.v26.26050 (2015)
78. Rohde H., Burdelski C., Bartscht K., Hussain M., Buck F., Horstkotte M.A., Knobloch J.K., Heilmann C., Herrmann M., Mack D.: Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* **55**, 1883–1895 (2005)
79. Rupp M.E., Archer G.L.: Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 231–245 (1994)
80. Sandiford S., Upton M.: Identification, characterization, and recombinant expression of epidermicin N101, a novel unmodified bacteriocin produced by *Staphylococcus epidermidis* that displays potent activity against staphylococci. *Antimicrol. Agents Chemother.* **56**, 1539–1547 (2012)

81. Scharschmidt T.C.: Establishing tolerance to commensal skin bacteria: timing is everything. *Dermatol. Clin*. **35**, DOI: 10.1016/j.det.2016.07.007 (2017)
82. Scharschmidt T.C., Fischbach M.A.: What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* **1**, 83–89 (2013)
83. Scheifele D.W., Bjornson G.L., Dyer R.A., Dimmick J.E.: Delta--like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infect. Immun*. **55**, 2268–2273 (1987)
84. Sharon I., Morowitz M.J., Thomas B.C., Costello E.K., Relman D.A., Banfield J.F.: Time series community genomics analysis reveals rapid shifts in bacterial species, strains, and phage during infant gut colonization. *Genome Res.* **23**, 111–120 (2013)
85. Sugimoto S., Iwamoto T., Takada K., Okuda K., Tajima A., Iwase T., Mizunoe Y.: *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.* **195**, 1645–1655 (2013)
86. Thomas S., Prendergast G.C. i wsp.: The host microbiome regulates and maintains human health: a primer and perspective for non microbiologists. *Cancer Res.* **15**, 1783–1812 (2017)
87. Tormo M.A., Knecht E., Gotz F., Lasa I., Penades J.R.: Bap--dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology,* **151**, 2465–2475 (2005)
88. Vandecandelaere I., Van Nieuwerburgh F., Deforce D., Coenye T.: Metabolic activity, urease production, antibiotic resistance and virulence in dual species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus. Plos One,* **12**, e0172700 (2017)
89. Vasconcelos N.G., Cunha M.L.R.: Staphylococcal enterotoxins: molecular aspects and detection methods. *J. Public Health Epidemiol*. **2**, 29–42 (2010)
90. Vuong C., Voyich J.M., Fischer E.R., Braughton K.R., Whitney A.R., DeLeo F.R., Otto M.: Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* **6**, 269–275 (2004)
91. Vuong C., Otto M.: *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect*. **4**, 481–489 (2002)
92. Wang R., Khan B.A., Cheung G.Y, Bach T.H., Jameson-Lee M., Kong K.F., Queck S.Y., Otto M.: *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest*. **121**, 238–248 (2011)
93. Wang R, Otto M. i wsp.:. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* **13**, 1510–1514 (2007)
94. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S.: Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science,* **295**, 1487 (2002)
95. Widerström M., Wiström J., Edebro H., Marklund E., Backman M., Lindqvist P., Monsen T.: Colonization of patients, healthcare workers, and the environment with healthcare-associated *Staphylococcus epidermidis* genotypes in an intensive care unit: a prospective observational cohort study. *BMC Infect. Dis.* DOI: 10.1186/s12879-016-2094-x (2016)
96. Widerström M., McCullough C.A., Coombs G.W., Monsen T., Christiansen K.J.: A multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone (ST2) is an ongoing cause of hospital-acquired infection in a Western Australian Hospital. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2147–2151 (2012)
97. Widerstrom M., Monsen T., Karlsson C., Wistrom J.: Molecular epidemiology of meticillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a Swedish county hospital: evidence of intra- and interhospital clonal spread. *J. Hosp. Infect.* **64**, 177–183 (2006)
98. Wu H., Moser C., Wang H.Z., Høiby N., Song Z.J.: Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci*. **7**, DOI: 10.1038/ijos.2014.65 (2014)
99. Ziebuhr W., Hennig S., Eckart M., Kranzler H., Batzilla C., Kozitskaya S.: Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **28**, 14–20 (2006)
100. Ziebuhr W., Heilmann C., Götz F., Meyer P., Wilms K., Straube E., Hacker J.: Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* **65**, 890–896 (1997)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 348–359
http://www.pm.microbiology.pl

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS JAKO CZYNNIK ETIOLOGICZNY ZAKAŻEŃ SZPITALNYCH

Beata Podgórska[1, 2]*, Danuta Kędzia[2]

[1] Elbląska Uczelnia Humanistyczno-Ekonomiczna w Elblągu
[2] Zakład Mikrobiologii, Szpital Wojewódzki w Koszalinie

Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w sierpniu 2018 r.

Streszczenie: Zakażenia związane z opieką medyczną oraz narastająca oporność bakterii na antybiotyki to obecnie dwa najważniejsze zagrożenia dla współczesnej medycyny i zdrowia publicznego. Bakterie *S. epidermidis* są mikroorganizmami komensalnymi, wchodzącymi w skład mikrobioty skóry i błon śluzowych człowieka. Jednocześnie obecnie stanowią jeden z ważniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych. Pod względem genotypowym *S. epidermidis* jest najbardziej zróżnicowanym gatunkiem w obrębie rodzaju *Staphylococcus*. Szczepy *S. epidermidis* należące obecnie do najczęściej izolowanego w szpitalach genotypu ST2 tworzą biofilm, wykazują oporność na metycylinę i wiele innych antybiotyków. Patogenne szczepy *S. epidermidis* są głównie odpowiedzialne za zakażenia krwi oraz zakażenia związane z obecnością biomateriałów w organizmie pacjenta. Leczenie zakażeń związanych z obecnością biofilmu jest trudne. Dodatkowo dużym wyzwaniem jest odróżnienie bakteriemii wywołanej przez bakterie *S. epidermidis* od kontaminacji próbek krwi.

1. Wprowadzenie. 2. Opis gatunku. 2.1. Struktura genomu. 2.2. Zróżnicowanie genotypowe. 3. Biofilm bakteryjny i strategie jego zwalczania. 4. Oporność na antybiotyki. 5. Epidemiologia i transmisja w środowisku szpitalnym. 5.1. Metody genotypowania. 6. Zakażenia wywoływane przez *S. epidermidis.* 6.1. Zakażenia łożyska naczyniowego. 6.2. Sepsa noworodków. 6.3. Infekcyjne zapalenie wsierdzia. 6.4. Zakażenia implantów ortopedycznych. 6.5. Zakażenia w okulistyce. 8.6. Zakażenia dróg moczowych. 7. Markery genetyczne szczepów szpitalnych. 8. Podsumowanie

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS AS A CAUSATIVE AGENT OF HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTIONS

Abstract: Healthcare-associated infections and antimicrobial resistance are two of the most important threats in the contemporary medicine, representing a serious burden for the public health system. Previously regarded only as an innocuous commensal microorganism of human skin, *S. epidermidis* is nowadays seen as an important opportunistic pathogen and the most frequent cause of nosocomial infections. *S. epidermidis* is the most genetically diverse species within the genus *Staphylococcus*. Strains belonging to ST2, the most frequently found clonal type of hospital-associated invasive *S. epidermidis*, are characterized by bacterial biofilm formation and resistance to methicillin, amongst other antibiotics. *S. epidermidis* is mainly responsible for bloodstream infections and other biomedical device-related infections. Treating infections characterized by biofilm formation is problematic. An additional challenge is differentiation between actual *S. epidermidis* bloodstream infections and blood probe contamination.

1. Introduction. 2. *S. epidermidis* characteristics. 2.1. Genome structure. 2.2. Genotypic diversity. 3. Bacterial biofilm and its combating strategies. 4. Antibiotic resistance. 5. Epidemiology and environmental transmission. 5.1. Genotyping methods. 6. *S. epidermidis* as infectious agent. 6.1. Bloodstream infections. 6.2. Neonatal sepsis. 6.3. Infective endocarditis. 6.4. Orthopedic infections. 6.5. Opthalmic infections. 6.6. Urinary tract infections. 7. Genetic markers for virulent hospital strain detection. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Staphylococcus epidermidis*, zakażenia szpitalne
Keywords: healthcare-associated infections, *Staphylococcus epidermidis*

1. Wprowadzenie

Zakażenia związane z opieką medyczną HAI (Healthcare-Associated Infections) oraz narastająca oporność bakterii na antybiotyki stanowią obecnie najważniejsze zagrożenia dla współczesnej medycyny i zdrowia publicznego [25]. Raport Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC) za lata 2011–2012 ujawnił, że częstość zakażeń związanych z opieką medyczną w Europie wynosi średnio 6% (od 2,3% do 10,8%, zależnie od kraju) [25].

Jednym z ważniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych jest *Staphylococcus epidermidis* [35, 48]. Bakterie te są wiodącym czynnikiem zakażeń krwi oraz zakażeń związanych z obecnością w organizmie człowieka biomateriałów [35]. Ryzyko tych zakażeń występuje głównie u pacjentów z deficytami immunologicznymi, u pacjentów poddawanych terapii immunosupresyjnej, wcześniaków, pacjentów zakażonych wirusem HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), długotrwale hospitalizowanych i krytycznie chorych [29, 37].

* Autor korespondencyjny: Beata Podgórska, Elbląska Uczelnia Humanistyczno-Ekonomiczna, ul. Lotnicza 2, 82-300 Elbląg; tel. 55 239 38 02; e-mail: pielegniarstwo@euh-e.edu.pl

Bakterie *S. epidermidis* są mikroorganizmami komensalnymi wchodzącymi w skład mikrobioty skóry i błon śluzowych człowieka [33]. Przez wiele dekad uważano, że zakażenia wywołane przez te mikroorganizmy mają źródło endogenne, którym są bakterie naturalnie kolonizujące skórę. Zakażenia HAI są na ogół wywoływane przez szczepy bakterii gatunku *S. epidermidis*, które występują i rozprzestrzeniają się endemicznie w środowisku szpitalnym [13, 16, 41, 71, 86]. Szpitalne szczepy *S. epidermidis* są patogenne, wytwarzają biofilm i wykazują oporność na antybiotyki [22, 23, 41, 90, 91]. Pierwsze doniesienia o zakażeniach HAI wywołanych przez *S. epidermidis* pojawiły się pod koniec lat 50 XX wieku i dotyczyły zapalenia wsierdzia oraz sepsy [19]. Dalsze badania wykazały systematyczny wzrost znaczenia *S. epidermidis* jako czynnika etiologicznego zakażeń szpitalnych [74, 81, 86, 90]. Obecnie obserwuje się rozprzestrzenianie się specyficznych, szpitalnych genotypów *S. epidermidis* w szpitalach na całym świecie [22, 56, 71, 90, 91].

Szczepy komensalnych bakterii *S. epidermidis*, które występują na skórze człowieka są często odpowiedzialne za kontaminację próbek krwi pobieranych od pacjentów. Większość (67%) dodatnich wyników hodowli z krwi, za które są odpowiedzialne bakterie *S. epidermidis* wynika z kontaminacji próbek krwi, a nie jest efektem bakteriemii [3]. Szybkie odróżnienie kontaminacji próbek krwi od zakażenia krwi wywołanego przez *S. epidermidis* do dziś pozostaje dużym problemem dla klinicystów i diagnostów laboratoryjnych [87]. Poszukiwane są markery genetyczne oraz metody, które by to umożliwiły i pozwoliły na podjęcie właściwej decyzji o sposobie postępowania z pacjentem [82]. Błędna diagnoza i włączenie antybiotyków stanowi ogromne i zbędne obciążenie dla organizmu pacjenta. Dodatkowo podnosi znacznie koszty związane z leczeniem pacjenta oraz przyczynia się do narastania oporności mikroorganizmów na antybiotyki [5]. Obecnie od 75% do 90% izolatów szpitalnych *S. epidermidis* wykazuje oporność na metycylinę MRSE (Methicillin Resistant *Staphylococcus epidermidis*) [59], a 85% z nich wykazuje także oporność na wiele innych antybiotyków MDRSE (Multidrug Resistant *S. epidermidis*) [88]. Szpitalne szczepy bakterii gatunku *S. epidermidis* są rezerwuarem genów oporności na antybiotyki dla innych mikroorganizmów w tym środowisku [4]. Bakterie te rozprzestrzeniają się w szpitalach oraz pomiędzy różnymi placówkami medycznymi na całym świecie i stwarzają coraz większe zagrożenie [56, 91].

Celem opracowania jest charakterystyka bakterii *S. epidermidis* jako mikroorganizu, który ma coraz większe znaczenie w zakażeniach związanych z opieką medyczną.

2. Opis gatunku

Bakterie *S. epidermidis* są głównym elementem mikrobioty skóry i błon śluzowych człowieka [33]. Należą do grupy koagulazo-ujemnych gronkowców CNS (Coagulase-Negative Staphylococci), co oznacza że nie wytwarzają koagulazy, enzymu odpowiedzialnego za krzepnięcie osocza krwi, który umożliwia ich odróżnienie od bakterii gatunku *Staphylococcus aureus* [8].

Grupa CNS obejmuje 38 gatunków bakterii [8], a ich lista jest wciąż uzupełniana [64]. Wśród nich największe znaczenie kliniczne ma *S. epidermidis.* Innymi CNS, rzadziej izolowanymi z zakażeń szpitalnych są: *S. saprophyticus*, *S. haemolyticucus*, *S. warneri*, *S. hominis*, S. *lugdunensis*, *S. capitis*, *S. caprae* [8, 89]**.**

2.1. Struktura genomu

Dotychczas poznano pełną strukturę materiału genetycznego kilku szczepów bakterii gatunku *S. epidermidis* m.in.: ATCC 12228, RP62A i BPH0662. Pozwala to na ich wykorzystanie jako szczepów kontrolnych w porównawczych analizach genetycznych, umożliwia obserwację ewolucji genomu bakterii *S. epidermidis*, badanie różnorodności klonalnej, badanie występowania czynników wirulencji czy poznanie molekularnych mechanizmów oporności na antybiotyki.

Pełną strukturę materiału genetycznego, nie tworzącego biofilmu, pozaszpitalnego szczepu ATCC 12228 przedstawił Zhang i wsp. [95]. Materiał genetyczny szczepu ATCC 12228 stanowi pojedynczy chromosom o długości 2.49 Mpz oraz sześć plazmidów. W porównaniu z genomem bakterii *S. aureus* (szczep N315), w genomie bakterii ATCC 12228 poza genami kodującymi δ (*hld*) i β hemolizyny (*hlb*) nie wykryto genów kodujących inne czynniki wirulencji, takich jakie występują u *S. aureus*. Stwierdzono obecność genów kodujących adhezyny, lecz brak genów operonu *ica,* które są odpowiedzialne za syntezę polisacharydu zewnątrzkomórkowego PIA i tworzenie biofilmu. Nie stwierdzono także obecności genu oporności na metycylinę (*mecA*) i mobilnych elementów genetycznych *IS256* i *IS257* [95]. Referencyjny szczep ATCC 12228 jest obecnie wykorzystywany jako szczep kontrolny w porównawczych analizach genetycznych oraz do wykrywania pozostałości antybiotyków w produktach spożywczych.

Referencyjny szczep RP62A – jest szpitalnym szczepem bakterii gatunku *S. epidermidis*. Bakterie te tworzą biofilm i są metycylinooporne MRSE (Methicillin Resistant *S. epidermidis*). Materiał genetyczny stanowi chromosom o długości 2.61 Mpz i jeden plazmid. W genomie bakterii znajduje się operon *icaADBC*, kaseta genetyczna SCC*mec*II niosąca gen *mecA* oraz mobilne elementy genetyczne *IS256* i *IS 257* [32].

Szczep BPH0662 – jest szpitalnym szczepem bakterii gatunku *S. epidermidis*, zaliczanym do genotypu ST2, który odpowiada obecnie za większość przypadków zakażeń szpitalnych na świecie. Bakterie szczepu BPH0662 tworzą biofilm i wykazują oporność na wiele różnych antybiotyków MDRSE (Multidrug-Resistant *S. epidermidis*). Ich materiał genetyczny występuje w postaci kolistego chromosomu o długości 2,79 Mpz oraz trzech plazmidów. W genomie bakterii występuje operon *icaADBC*, kasta genetyczna SCC*mec*III wraz z genem *mecA* oraz mobilne elementy IS w wielu kopiach [46].

2.2. Zróżnicowanie genotypowe

Bakterie *S. epidermidis* są najbardziej zróżnicowanym pod względem genotypowym gatunkiem w obrębie rodzaju *Staphylococcus* [8, 50, 54]. Nawet w obrębie populacji bakterii kolonizujących organizm jednego zdrowego człowieka jako gospodarza występuje znaczne zróżnicowanie klonalne [16].

Badania izolatów *S. epidermidis* ze środowisk szpitalnych i pozaszpitalnych ujawniły występowanie genotypów specyficznych dla każdego z tych środowisk, a nawet takich, które umożliwiają bakteriom przetrwanie w obu tych środowiskach [23, 71].

W środowisku szpitalnym na całym świecie przeważają obecnie genotypy ST2 (Sequence Type 2) (od 74% do 85%) należące do kompleksu klonalnego 2 (CC2) [16, 54, 88]. Znacznie rzadziej i głównie w szpitalach w USA izolowane są genotypy ST5 [50].

Bakterie o genotypach należących do linii ST2 są odpowiedzialne za większość zakażeń związanych z opieką medyczną (HAI) [16], wytwarzają biofilm bakteryjny [46] oraz wykazują oporność na metycylinę (MRSE) i wiele innych antybiotyków (MDRSE) [16, 23, 50, 71, 88]. Globalne rozpowszechnienie genotypu ST2 sugeruje udaną adaptację tych bakterii do środowiska szpitalnego.

Ogromną różnorodność genotypową, oporność na różne antybiotyki oraz przystosowanie do środowiska szpitalnego, bakterie *S. epidermidis* zawdzięczają zwiększonej zdolności rekombinacji, licznym rearanżacjom chromosomalnym oraz wielokrotnemu przenoszeniu mobilnych elementów genetycznych, np. kaset genetycznych SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*), elementów IS (Insertion Sequences) czy transpozonów Tn (Transposon) [23, 53, 54].

Sekwencje insercyjne IS to krótkie fragmenty DNA, które mogą przemieszczać się w genomie bakterii wraz z sąsiadującymi z nimi genami. W genomie szpitalnych szczepów bakterii należących do linii ST2 występują w wielu kopiach głownie elementy inercyjne *IS256.* Są one częścią transpozonu *Tn4001*, który nadaje gronkowcom oporność na aminoglikozydy [43]. Ponadto elementy *IS256* mają wpływ na ekspresję operonu *ica* oraz produkcję egzopolisacharydu PIA, syntetyzowanego przez szczepy bakterii tworzące biofilm [43, 63].

Kasety genetyczne SCC*mec* zawierają gen *mecA*, który warunkuje oporność gronkowców na metycylinę i inne antybiotyki β-laktamowe (rozdz. 4). Wysoka presja antybiotyków i środków przeciwdrobnoustrojowych w środowisku szpitalnym sprzyja selekcji szczepów opornych.

Wymiana materiału genetycznego pomiędzy bakteriami w środowisku szpitalnym, pozyskiwanie, bądź utrata ruchomych elementów genetycznych pozwala na powstawanie nowych wariantów genotypowych i fenotypowych bakterii, co umożliwia im przystosowanie się do środowiska szpitalnego [96].

Do badań różnorodności genotypowej *S. epidermidis* oraz badań epidemiologicznych, umożliwiających kontrolę ich rozprzestrzeniania wykorzystuje się najczęściej metody MLST i RLFP (rozdz. 5.1).

3. Biofilm bakteryjny i strategie jego zwalczania

Jednym z kluczowych elementów, które mają wpływ na patogenezę zakażeń HAI wywoływanych przez *S. epidermidis* jest biofilm tworzony przez niektóre szczepy tych bakterii [63].

Około połowa wszystkich zakażeń HAI ma związek z wytwarzaniem przez bakterie biofilmu na powierzchniach wprowadzanych do organizmu pacjenta biomateriałów (np. cewników naczyniowych, cewników urologicznych, implantów ortopedycznych, sztucznych zastawek serca itp.) [92].

Tworzony przez *S. epidermidis* biofilm składa się z wielu warstw komórek bakterii, stabilizowanych przez zewnątrzkomórkowy egzopolisacharyd PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), który jest polimerem N-acetyloglukozaminy. Enzymy, które biorą udział w syntezie PIA są kodowane przez geny zorganizowane w operonie *ica* (intercellular adhesion) (*icaA*, *icaD*, *icaB, icaC*) [96]. Około 87% szpitalnych szczepów bakterii gatunku *S. epidermidis*, które posiadają geny *ica* wytwarza biofilm bakteryjny, stąd ich obecność uznaje się za jeden z głównych markerów patogenności tych bakterii [97].

Tworzenie biofilmu jest jedną ze strategii umożliwiających bakteriom przetrwanie i przystosowanie się do środowiska życia [92]. Zewnątrzkomórkowa macierz biofilmu, utworzona przez egzopolimery: PIA i kwas poli-γ-DL-glutamowy PGA (Poly-γ-Glutamic Acid) [42, 96] zapewnia bakteriom ochronę przed dostępem antybiotyków i odpowiedzią układu immunologicznego człowieka [11]. Wykazano, że w stosunku do bakterii wolno-żyjących (form planktonicznych), oporność na antybiotyki bakterii w biofilmie wzrasta

nawet ponad tysiąckrotnie [12]. Przyczyną tego jest obniżenie aktywności metabolicznej, zwolnienie tempa replikacji DNA i podziałów komórek bakterii żyjących w biofilmie. W efekcie prowadzi to do obniżenia skuteczności działania antybiotyków, które celują w szybko rosnące komórki bakterii i są często wykorzystywane w leczeniu zakażeń gronkowcowych, np. antybiotyków β-laktamowych czy aminoglikozydów [12, 63]. Eksperymentalnie wykazano także, że komórki bakterii, które są uwolnione z biofilmu wykazują wyższą oporność na antybiotyki powszechnie stosowane w leczeniu zakażeń gronkowcowych niż formy wolno-żyjące tych bakterii, a nawet te, które pozostają w biofilmie [27].

Leczenie zakażeń związanych z obecnością biofilmu na powierzchniach biomateriałów wprowadzonych do organizmu pacjenta jest skomplikowane i stanowi obecnie duże wyzwanie dla mikrobiologów i klinicystów. Wymaga doboru antybiotyków, które dobrze penetrują w głąb biofilmu [92]. Konieczne jest również miejscowe albo układowe podawanie zwiększonych dawek tych antybiotyków, w różnych ich kombinacjach. Pomocnym może być także podawanie środków hamujących aktywność systemu quorum sensing, który kontroluje formowanie i dojrzewanie biofilmu lub środków rozpraszających biofilm [92]. Obserwacje kliniczne oraz badania eksperymentalne wyraźnie wskazują, że leczenie antybiotykami jest zwykle niewystarczające, aby wyeliminować zakażenie związane z występowaniem biofilmu. W większości przypadków niezbędne jest również usunięcie z organizmu pacjenta cewnika czy innego biomateriału, na którym utworzył się biofilm [92].

Wciąż poszukuje się skutecznych metod eliminacji biofilmu, bez konieczności usuwania biomateriałów, m.in. rozważa się terapię z zastosowaniem bakteriofagów [94].

Dokładny opis etapów tworzenia biofilmu opis czynników adhezji oraz innych czynników wirulencji bakterii *S. epidermidis* znajduje się w artykule pt. „Dwa oblicza bakterii *Staphylococcus epidermidis*, czyli od komensala do patogenu" w aktualnym zeszycie *Postępów Mikrobiologii* na stronie nr 338.

4. Oporność na antybiotyki

Bakterie *S. epidermidis* wchodzące w skład mikrobioty skóry zdrowego człowieka zwykle nie stwarzają problemu klinicznego, jednak szczepy szpitalne wykształciły oporność na wiele środków przeciwbakteryjnych i stanowią poważne wyzwanie dla dzisiejszej medycyny [88].

Pierwsze szczepy bakterii *S. epidermidis* oporne na penicylinę pojawiły się już w 1949 r. [8]. Oporność bakterii *S. epidermidis* na penicylinę jest efektem wytwarzania przez nie enzymu β-laktamazy, który katalizuje reakcję hydrolizy pierścienia β-laktamowego antybiotyku. Gen kodujący β-laktamazę (*bla*Z) znajduje się na plazmidzie, co znacznie ułatwia jego transfer pomiędzy bakteriami. Obecnie ponad 90% izolatów szpitalnych *S. epidermidis* produkuje β-laktamazy i wykazuje oporność na penicyliny [8].

Antybiotykami, które nie podlegają aktywności bakteryjnych penicylinaz są metycylina i oksacylina. Jednak obecnie od 75 do 95% izolatów szpitalnych *S. epidermidis* wykazuje oporność także na te antybiotyki [14, 50, 59], przewyższając pod tym względem nawet oporność bakterii *S. aureus* (od 40% do 60%) [59].

Oporność gronkowców na metycylinę jest warunkowana obecnością genu *mecA*, który znajduje się w obrębie kasety genetycznej SCC*mec* zlokalizowanej w chromosomie bakterii. Gen *mecA* koduje zmienione białko wiążące penicylinę PBP2a (lub PBP2') (Penicillin Binding Protein 2a), które posiada obniżone powinowactwo do antybiotyków β-laktamowych [8]. Szczepy bakterii oporne na metycylinę wykazują krzyżową oporność z innymi antybiotykami β-laktamowymi (nawet jeśli w testach *in vitro* wykazują wrażliwość na niektóre z nich) [2]. Oznacza to, że metycylinooporne szczepy bakterii są oporne także na penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy i monobaktamy. Wyjątkiem są ceftobiprol oraz ceftarolina, antybiotyki z grupy cefalosporyn V generacji, które wykazują aktywność przeciw szczepom metycylinoopornym [8].

Dotychczas zidentyfikowano 11 typów kaset SCC*mec* [40]. U *S. epidermidis* najczęściej (36%) występuje krótki element SCC*mec* typu IV [63]. Mały rozmiar kasety typu IV sprawia, że jest to element najbardziej mobilny i może rozprzestrzeniać się wśród bakterii nawet w środowisku pozaszpitalnym, gdzie nie są poddawane presji antybiotyków [4]. Wraz z kasetą SCC*mec* bakteriom przekazywany jest także gen *mecA* [63]. W konsekwencji może to prowadzić do nabywania oporności na metycylinę także przez pozaszpitalne szczepy bakterii.

Metycylinooporne szczepy bakterii gatunku *S. epidermidis* (MRSE) stanowią rezerwuar genów *mecA* dla innych bakterii, w tym także szczepów bakterii gatunku *S. aureus* wrażliwych na metycylinę MSSA (Methicillin Susceptible *S. aureus*). Wskazuje na to wysoka homologia (98%) sekwencji nukleotydów w kasetach genetycznych SCC*mec* u metycylinoopornych szczepów bakterii gatunku *S. epidermidis* (MRSE) i *S. aureus* (MRSA) [32]. Obecnie uważa się, że oporność *S. aureus* na metycylinę jest efektem horyzontalnego transferu kaset genetycznych SCC*mec* z metycylinoopornych szczepów bakterii gatunku *S. epidermidis* [4].

Duże zróżnicowanie kaset SCC*mec* u metycylinoopornych szczepów szpitalnych *S. epidermidis* HA-MRSE (Hospital-Associated Methicillin Resistant *S. epidermidis*) wskazuje na możliwość częstego

pozyskiwania i utraty tych ruchomych elementów genetycznych, co może przyczyniać się także do zwiększenia różnorodności genotypowej bakterii *S. epidermidis* [63]. Znacznie mniejsze zróżnicowanie kaset SCC*mec* występuje wśród szczepów pozaszpitalnych CA-MRSE (Community-Associated Methicillin Resistant *S. epidermidis*), u których wykryto obecność jedynie kaset typu IV i V [63].

Około 85% metycylinooopornych izoltów *S. epidermidis* wykazuje jednocześnie oporność na wiele innych antybiotyków MDRSE (Multidrug-Resistant *S. epidermidis*) [88].

Obecnie większość (ok. 90%) izolatów klinicznych *S. epidermidis* posiada gen *mecA* i wykazuje oporność na metycylinę/oksacylinę [14, 59]. Z tego powodu w szpitalach do leczenia zakażeń wywołanych przez szczepy MRSE jako leki pierwszego rzutu stosowane są glikopeptydy, w tym wankomycyna i teikoplanina. Koagulazo-ujemne gronkowce jako pierwsze wykształciły oporność na antybiotyki glikopeptydowe. Od końca lat 80 XX wieku obserwuje się ciągłe narastanie oporności CNS, w tym także *S. epidermidis*, na te antybiotyki [9]. Obecnie bakterie *S. epidermidis* wykazują wyższy poziom oporności na teikoplaninę niż na wankomycynę [9]. Mechanizm oporności *S. epidermidis* na antybiotyki glikopeptydowe pozostaje wciąż niewyjaśniony. Przypuszczalnie może wiązać się ze zwiększeniem grubości ściany komórkowej tych bakterii [9]. Obniżona wrażliwość bakterii na teikoplaninę może być wynikiem heterogennego fenotypu oporności szczepów *S. epidermidis*, co może sugerować także predyspozycje bakterii do ich naturalnej oporności na ten antybiotyk [77]. Wykryto także heterogenny fenotyp oporności szczepów bakterii *S. epidermidis* na wankomycynę [20]. Dotychczas nie stwierdzono u nich wysokiego poziomu oporności na ten antybiotyk, natomiast notuje się wzrost oporności średniego poziomu [14]. Jednak większość szczepów *S. epidermidis* wciąż wykazuje wrażliwość na ten antybiotyk [59, 90].

Szybko narasta także oporność *S. epidermidis* na fluorochinolony (np. ciprofloksacynę) [93]. Jest to grupa środków przeciwbakteryjnych stosowanych m.in. do leczenia sepsy oraz w zakażeniach okulistycznych [93]. Mechanizm działania fluorochinolonów polega na hamowaniu replikacji DNA w komórkach bakterii, poprzez hamowanie aktywności gyrazy i topoizomerazy IV, enzymów które biorą udział w replikacji DNA. Oporność *S. epidermidis* na te antybiotyki może wiązać się także z ich aktywnym usuwaniem z komórki bakterii (efflux) [17] lub z powstawaniem punktowych mutacji w rejonie QRDR (zawierającym geny *gyr*A, *gyr*B, *par*C i *par*E). Efektem tych mutacji jest zmiana docelowego miejsca wiązania antybiotyku [93]. Najwyższy oporności na fluorochinolony jest efektem mutacji w genach *gyrA* i *parC* [93].

Bakterie *S. epidermidis* wykazują także oporność na erytromycynę [85] i klindamycynę [13]. Klindamycyna jest antybiotykiem powszechnie stosowanym do leczenia zakażeń gronkowcowych, głównie u pacjentów z alergią na penicyliny oraz do leczenia zakażeń tkanek miękkich, wywołanych przez gronkowce, zarówno oporne jak i wrażliwe na metycylinę [30]. Mechanizm działania erytromycyny polega na jej wiązaniu z podjednostką 50S rybosomu bakteryjnego i hamowaniu syntezy białek. Oporność *S. epidermidis* na makrolidy (erytromycyna) i linkozamidy (klindamycyna) polega m.in. na modyfikacji podjednostki 23S rRNA przez metylotransferazę (kodowaną przez geny *emr*), czego efektem jest zmiana docelowego miejsca wiązania antybiotyku. Prowadzi to do krzyżowej oporności z linkozamidami i streptograminą, co nazwane jest fenotypem oporności MLS_B (makrolidy, linkozamidy, streptograminaB) [30, 85].

Izolaty szpitalne *S. epidermidis* wykazują także oporność na inne antybiotyki powszechnie stosowane w zakażeniach gronkowcowych np. na gentamycynę (79%), trimetoprim/sulfmetoksazol (76%), rifampicynę (39%) [34] oraz tetracyklinę, chloramfenikol i sulfonamidy [63].

Niepokojącym zjawiskiem jest szybko narastająca oporność *S. epidermidis* na mupirocynę. Przyczyną tego zjawiska jest nadużywanie tego antybiotyku [8]. Mupirocyna ma zastosowanie do miejscowej dekolonizacji szczepów MRSA i MRSE u pacjentów przygotowywanych do zabiegów chirurgicznych [6]. W Niemczech niski i wysoki stopień oporności na mupirocynę wykazuje odpowiednio 9,4% i 3,3% izolatów *S. epidermidis*, w USA oporność na ten antybiotyk wykazuje aż 24% izolatów gronkowców koagulazo-ujemnych [73], natomiast w Szwecji, gdzie antybiotyk ten jest ściśle zarezerwowany do przedoperacyjnej dekolonizacji, oporność wykazuje 1,6% izolatów *S. epidermidis* [75]. Geny oporności na mupirocynę (*mupA)* znajdują się na plazmidach, co ułatwia ich transfer pomiędzy bakteriami, także innych gatunków, m.in. *S. aureus*. Plazmidy te niosą równocześnie geny oporności na klindamycynę, erytromycynę, lewofloksacynę i tetracyklinę [8].

Obecnie prawie wszystkie szczepy *S. epidermidis* pozostają wrażliwe na nowsze antybiotyki, takie jak daptomycyna, tigecyklina, linezolid, dalbawacyna [66, 85].

Linezolid należy do grupy oksazolidynonów. Jest to nowa grupa syntetycznych antybiotyków hamujących syntezę białek w komórkach bakterii poprzez ich wiązanie z podjednostką 23S rRNA. Oporność na linezolid u gronkowców CNS występuje bardzo rzadko (< 1%) [26]. Znane są jednak przypadki wystąpienia ognisk epidemicznych szczepów *S. epidermidis* opornych także na ten antybiotyk [83]. Mechanizm oporności *S. epidermidis* na linezolid polega na powstawaniu punktowych mutacji w genie kodującym podjed-

nostkę 23S rRNA (G2576U, G2447U, U2504A, C2534U i G2631U), co ostatecznie prowadzi do utraty powinowactwa antybiotyku do rybosomów. Inne mechanizmy oporności polegają na powstawaniu mutacji w genach kodujących białka rybosomalne L4 i L22 lub na enzymatycznej modyfikacji podjednostki 23S rRNA przez metylazę, kodowaną przez gen *cfr* (chloramfenicol-florfenicol resistance) [67].

Daptomycyna to lipopeptydowy antybiotyk stosowany z powodzeniem w leczeniu ciężkich zakażeń skóry, zakażeń tkanek miękkich, bakteriemii czy zapaleniu wsierdzia, wywoływanych m.in. przez gronkowce oporne na metycylinę i wankomycynę [24, 58]. Działanie antybiotyku polega m.in. na uszkadzaniu błony cytoplazmatycznej w komórkach bakterii [79]. Dotychczas doniesienia o oporności gronkowców na daptomycynę dotyczą głównie bakterii *S. aureus*.

5. Epidemiologia i transmisja w środowisku szpitalnym

W ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci szpitalne szczepy *S. epidermidis*, tworzące biofilm i oporne na antybiotyki wyłoniły się jako jeden z ważniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych, jednak wciąż niewiele wiadomo na temat ich epidemiologii. Prowadzone dotychczas w środowisku szpitalnym badania epidemiologiczne skupiały się głównie na szczepach MRSA. Okazuje się, że obecnie w placówkach opieki medycznej nie mniejsze zagrożenie stanowią szczepy MRSE i MDRSE [86]. Rezerwuarem tych bakterii w środowisku szpitalnym są pacjenci, personel medyczny a także środowisko szpitalne [86].

Wielu pracowników (od 30% do 89%) placówek opieki medycznej jest nosicielami szpitalnych genotypów HA-MRSE [23, 86]. Bakterie te wykrywano głównie w jamie nosowej oraz na rękach personelu medycznego [87]. Pracownicy, którzy są nosicielami tych bakterii stanowią źródło zakażenia dla pacjentów [60]. Ręce personelu medycznego są głównym wektorem transmisji opornych na antybiotyki szpitalnych szczepów bakterii [36]. Mogą na to wskazywać przeprowadzone analizy genetyczne (16S rRNA, *mecA*, *icaA*) oraz analizy fenotypów oporności bakterii na antybiotyki. Badania te ujawniły, że 90% izolatów bakterii, które były odpowiedzialne za zakażenia krwi u noworodków, było blisko spokrewnionych z izolatami bakterii pobranych z rąk personelu oddziałów intensywnej terapii noworodków (OITN) [36]. Transmisja bakterii przez ręce personelu medycznego jest przyczyną krzyżowych zakażeń szpitalnych [36].

W oddziałach intensywnej terapii ponad 90% różnych powierzchni (np. sprzętu medycznego, ścian, podłóg, drzwi itp.) oraz 93% powierzchni mebli szpitalnych może być skontaminowana przez szpitalne szczepy bakterii, które występują tam głównie w formie biofilmu [38]. Kontaminacja środowiska, przez szpitalne szczepy bakterii przyczynia się w dużym stopniu do kolonizacji pacjentów przez te bakterie [38, 41]. Jednym z czynników ryzyka kolonizacji pacjentów tymi patogennymi szczepami bakterii jest przedłużająca się hospitalizacja pacjenta [86]. Pacjenci już po trzech dniach od przyjęcia na oddział mogą być kolonizowani opornymi na antybiotyki szpitalnymi szczepami bakterii, np. MRSE [86]. Istotnym czynnikiem, który pozwala minimalizować ryzyko kolonizacji pacjentów przez szpitalne szczepy bakterii i ryzyko zakażeń szpitalnych jest skrócenie czasu pobytu pacjentów na oddziale, np. przed planowaną operacją [86].

Obserwowane jest ciągłe przemieszczanie wielooopornych szczepów bakterii gatunku *S. epidermidis* pomiędzy szpitalami i jednostkami medycznymi na całym świecie [56, 91]. Do tej transmisji najczęściej dochodzi przez przemieszczanie pacjentów skolonizowanych tymi bakteriami [22, 56, 91].

Niepokojące doniesienia z całego świata na temat wzrostu znaczenia bakterii *S. epidermidis* w zakażeniach szpitalnych oraz ich narastającej oporności na antybiotyki podkreślają pilną potrzebę wdrożenia skutecznych programów zapobiegania i kontroli rozprzestrzeniania tych mikroorganizmów. Pozwoli to na zminimalizowanie transmisji szczepów wytwarzających biofilm i opornych na antybiotyki.

5.1. Metody genotypowania

Pojawienie się w środowisku szpitalnym szczepów *S. epidermidis* wytwarzających biofilm i opornych na antybiotyki stwarza zagrożenie dla pacjentów i pracowników oraz problemy dla placówki medycznej. Z tego względu istotna jest możliwość kontroli występowania i rozprzestrzeniania się tych szczepów bakterii w szpitalu, pomiędzy szpitalami i innymi jednostkami opieki medycznej we wszystkich rejonach świata [22, 91].

Do badania różnorodności geneotypowej *S. epidermidis* oraz dróg ich transmisji, wykorzystuje się różne metody genotypowania, są to m.in.: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), rep-PCR (Repetitive Sequence-Based PCR), MLVA (Multilocus Variable Analysis) [53]. Jednak za „złoty standard", a zarazem metodę o najwyższej sile dyskryminacji uznaje się obecnie metodę PFGE – elektroforeza pulsacyjna w zmiennym polu elektrycznym (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), która jest oparta na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA bakterii. Pozwala na wykrywanie zmian zachodzących w genomie bakterii, takich jak insercje, delecje i rearanżacje [53]. Metoda ta umożliwia wykrycie

powiązań klonalnych między izolatami *S. epidermidis* i jest szczególnie przydatna do badań epidemiologicznych obejmujących krótki okres czasu, np. podczas epidemii szpitalnej [50, 53].

Do badań długookresowych najczęściej obecnie stosuje się metodę MLST (Multilocus Sequence Typing) [1], która umożliwia określenie relacji filogenetycznych bakterii. Metoda ta opiera się na analizie mutacji punktowych w sekwencji nukleotydowej konserwatywnych fragmentów DNA, siedmiu genów metabolizmu podstawowego (w których zmienność zachodzi najwolniej), tzw. „housekeeping genes" [80]. Określone warianty sekwencji nukleotydów amplifikowanego genu składają się na typ sekwencyjny ST (Sequence Type). Szczepy spokrewnione ewolucyjnie, o nieznacznie zróżnicowanych typach ST, tworzą kompleksy klonalne CC (Clonal Complexes). Typowanie MLST pozwala na ocenę pokrewieństwa klonalnego, badanie rozprzestrzeniania klonów bakteryjnych, określenie zasięgu ich występowania oraz na badania długoterminowej zmienności bakterii [54, 80].

6. Zakażenia wywoływane przez *S. epidermidis*

6.1. Zakażenia łożyska naczyniowego

Zakażenie łożyska naczyniowego BSI (Bloodstream Infection) jest jedną z najcięższych postaci zakażeń występujących u pacjentów hospitalizowanych i wiąże się z ich wysoką śmiertelnością [7]. Większość (81%) przypadków bakteriemii ma związek z pobytem pacjenta w szpitalu lub z inną formą opieki medycznej [65]. Najwyższy odsetek zakażeń BSI notowany jest na oddziałach intensywnej opieki medycznej oraz oddziałach transplantologii [65]. Liczba tych zakażeń wciąż rośnie, co jest związane ze wzrostem częstości stosowania inwazyjnych technik leczniczych i diagnostycznych [3, 7, 74]. Bakteriemia może prowadzić do sepsy, która wiąże się z ciężkim stanem klinicznym pacjenta. U niektórych pacjentów może przechodzić w postać ciężką, związaną z wysoką śmiertelnością, sięgającą nawet do 50%, a nawet we wstrząs septyczny [44].

Głównym czynnikiem ryzyka zakażeń łożyska naczyniowego wywoływanych przez *S. epidermidis* jest stosowanie obwodowych i centralnych cewników naczyniowych [51, 65]. Cewniki naczyniowe są obecnie nieodzownym elementem procedur leczniczych i diagnostycznych. Umożliwiają podawanie leków, transfuzję krwi, żywienie pozajelitowe, uzupełnianie płynów i elektrolitów a także wykonywanie badań diagnostycznych czy hemodializę. Ryzyko zakażenia wzrasta wraz z czasem utrzymania cewnika w łożysku naczyniowym [39]. Bakterie *S. epidermidis* i inne CNS są wiodącym czynnikiem zakażeń krwi związanych z obecnością cewników naczyniowych. Ma to związek z tworzeniem przez te bakterie biofilmu na powierzchniach cewnika. Obecność biofilmu wykrywano na powierzchniach wewnętrznych i zewnętrznych od 8% do 40% cewników naczyniowych usuwanych z organizmu pacjentów [74].

Bakterie *S. epidermidis* mogą być także przyczyną powikłań związanych z zastosowaniem cewników naczyniowych, m.in.: zakażeń w miejscu wkłucia, powstawania ropni, zakrzepowego zapalenia żył czy zapalenia wsierdzia [51].

6.2. Sepsa noworodków

Bakterie *S. epidermidis* oraz inne CNS, są wiodącymi czynnikami etiologicznymi późnej sepsy u noworodków LOS (Late-Onset Sepsis), która manifestuje się po 72 godzinach życia noworodków i jest jedną z głównych przyczyn ich śmierci. Ryzyko wystąpienia sepsy jest najwyższe u noworodków o niskiej masie urodzeniowej (poniżej 1500 g) i dotyczy ok. 25% spośród nich [10, 68].

Głównym czynnikiem ryzyka wystąpienia u noworodków bakteriemii o etiologii *S. epidermidis* jest stosowanie centralnych cewników naczyniowych, które są niezbędne do dostarczenia do organizmów tych dzieci składników odżywczych, płynów i leków. Szczególnie wysokie ryzyko zakażeń stwarzają także cewniki pępowinowe, z uwagi na występowanie bakterii *S. epidermidis* w kikucie pępka. Utrzymywanie cewników pępowinowych i żylnych ponad 5 dni zwiększa ryzyko wystąpienia sepsy wywołanej przez CNS odpowiednio o 21 i 16 razy [39].

6.3. Infekcyjne zapalenie wsierdzia

Bakterie *S. epidermidis* wraz z innymi CNS (ok. 8%) są coraz częściej przyczyną infekcyjnego zapalenia wsierdzia (infective endocarditis). Jest to choroba, która dotyczy głównie osób w starszym wieku, ale także osób poddawanych inwazyjnym procedurom medycznym, związanym z wszczepieniem sztucznej protezy zastawkowej, czy stymulatora serca. Może także być wynikiem zakażeń naturalnych zastawek serca [15].

Zapadalność na infekcyjne zapalenie wsierdzia jest stosunkowo niska, wynosi od 1,5 do 4,95 przypadków na 100 000 osób na rok, jednak wiąże się z wysoką śmiertelnością tych pacjentów (od 14 do 46%) [47].

Przebieg kliniczny zakażeń wywołanych przez CNS jest ciężki i często prowadzi do zniszczenia własnych zastawek serca pacjenta, powstawania ropni mięśnia sercowego, niewydolności serca i śmierci pacjenta (25%). Zakażenia te wymagają częściej interwencji chirurgicznej (60%) w porównaniu z zakażeniami wywołanymi przez *S. aureus* [15].

6.4. Zakażenia implantów ortopedycznych

Bakterie *S. aureus* i *S. epidermidis* są odpowiedzialne za większość (75%) zakażeń implantów ortopedycznych PJI (Prothetic Joint Infection). Zakażenia PJI mają związek z tworzniem przez bakterie biofilmu na powierzchniach implantów [57].

Implanty ortopedyczne poprawiają jakość życia i przywracają funkcje życiowe pacjentom cierpiącym z powodu chorób stawów, chorób kości lub złamań. Coraz więcej ludzi na całym świecie korzysta z zabiegów rekonstrukcji stawu biodrowego, kolanowego czy innych zabiegów, w których wykorzystywane są implanty ortopedyczne. Zakażenia związane z wszczepieniem implantów ortopedycznych należą do najczęściej występujących powikłań w ortopedii. Mogą prowadzić do septycznego zapalenia stawów, zapalenia szpiku kostnego, a w efekcie do niszczenia stawów i kości [70].

Zakażenia PJI generują wysokie koszty związane z ich leczeniem. Oszacowano, że w USA na operacje rewizyjne wydaje się ponad 566 mln. dolarów rocznie [45]. Ze względu na wzrost częstości wykonywanych zabiegów alloplastyki stawów w nieodległym czasie zakażenia implantów ortopedycznych mogą stać się ogromnym problemem nie tylko dla pacjentów, ale także dla placówek opieki medycznej.

6.5. Zakażenia w okulistyce

Bakterie *S. epidermidis* są jednym z najważniejszych czynników etiologicznych pooperacyjnych zakażeń wnętrza gałki ocznej (endophtalmitis) [55, 62]. Zakażenia te są często występującym powikłaniem m.in. po operacji zaćmy z wszczepieniem sztucznych soczewek oka [52].

U noworodków zapalenie wnętrza gałki ocznej może być zakażeniem wtórnym, którego pierwotnym źródłem jest bakteriemia o etiologii *S. epidermidis* [69].

6.6. Zakażenia dróg moczowych

Zakażenia dróg moczowych UTI (Urinary Tract Infection) są jedną z najczęściej występujących postaci klinicznych zakażeń szpitalnych [25]. Spośród CNS głównym czynnikiem zakażeń dróg moczowych jest *S. saprophyticus* (64%) [37]. Inne CNS, w tym także *S. epidermidis* rzadziej są przyczyną tego typu zakażeń (35%) [84].

Znaczenie *S. epidermidis*, jako czynnika etiologicznego zakażeń dróg moczowych wzrasta u pacjentów z założonym cewnikiem moczowym CA-UTI (Catheter Associated Urinary Tract Infection) [18]. Oszacowano, że od 70% do 80% wszystkich przypadków zakażeń układu moczowego jest związana z obecnością cewnika w drogach moczowych pacjenta, a ryzyko wystąpienia zakażenia wrasta wraz z czasem jego utrzymania [76]. Zakażenia CA-UTI podnoszą ryzyko zgonu pacjentów o 12% [72].

W zakażeniach odcewnikowych biorą udział głównie szczepy bakterii tworzące biofilm. Bakterie *S. epidermidis* są częściej odpowiedzialne za zakażenia CA-UTI (74%) niż *S. aureus* (26%) [18].

Bakterie *S. epidermidis* mogą tworzyć biofilm także na powierzchni pęcherza moczowego. Wskazują na to eksperymenty prowadzone na myszach. Jednak kinetyka tworzenia biofilmu przez *S. epidermidis* jest znacznie niższa w porównaniu do kinetyki biofilmów tworzonych przez *E. coli* lub *S. saprophyticus* [49].

7. Markery genetyczne szczepów szpitalnych

Większość dodatnich wyników hodowli i posiewów krwi uzyskiwanych w laboratoriach diagnostycznych jest efektem kontaminacji próbek krwi przez bakterie *S. epidermidis* i inne CNS [3, 65]. Dużym problemem diagnostycznym wciąż pozostaje szybkie odróżnienie zakażenia krwi od kontaminacji próbki krwi wywołanymi przez te bakterie [87].

Według definicji zakażenia łożyska naczyniowego BSI (Blood Stream Infection) (laboratoryjnie potwierdzone zakażenie łożyska naczyniowego), opracowanej przez ECDC, rozpoznanie takiego zakażenia wywołanego przez mikroorganizmy CNS (wchodzące w skład mikrobioty skóry) może nastąpić między innymi na podstawie dwóch dodatnich posiewów krwi. W przypadku gdy zakażenie łożyska naczyniowego jest związane z obecnością cewnika naczyniowego definicja wskazuje, że ten sam drobnoustrój powinien być wyizolowany również z końcówki cewnika naczyniowego (a objawy zakażenia powinny ustąpić w ciągu 48 godzin od usunięcia cewnika naczyniowego) [61].

Zakażenia krwi są ciężką postacią zakażeń u pacjentów hospitalizowanych i wymagają natychmiastowego włączenia do terapii antybiotyków. Tradycyjne metody diagnostyczne powszechnie stosowane w laboratoriach bakteriologicznych, takie jak hodowle krwi i posiewy są długotrwałe, dlatego wciąż poszukiwane są metody, które umożliwiłyby szybkie odróżnienie kontaminacji próbek krwi od bakteriemii wywołanej przez *S. epidermidis* czy inne CNS. Obecnie w tym celu najczęściej wykorzystuje się markery genetyczne [82].

Markerami genetycznymi, które mogą wskazywać na obecność patogennych szczepów *S. epidermidis* są: gen *mecA* (warunkuje oporność bakterii na metycylinę), gen *icaA* (wchodzi w skład operonu *icaADBC*, odpowiedzialnego za kodowanie egzopolisacharydu PIA, występuje u szczepów bakterii wytwarzających

biofilm) [28, 29], elementy IS*256* (mobilne elementy genetyczne występujące w wielu kopiach w genomie patogennych szczepów szpitalnych) [43], gen *sesD* (*bhp*) (koduje białko powierzchniowe Ses, które jest adhezyną i bierze udział w adhezji i formowaniu biofilmu) [78]. Natomiast markerami szczepów komensalnych mogą być np.: gen *fdh* (koduje dehydrogenazę mrówczanową) [16] oraz element ACME (Arginine Catabolic Mobile Element) (mobilny element genetyczny, w obrębie którego znajdują się geny kodujące enzym zaangażowany w katabolizm argininy) [16, 23, 82]. Rzadziej wykorzystywaną metodą z powodu niskiej siły dyskryminacji jest badanie wytwarzania biofilmu przez wyizolowane szczepy bakterii *S. epidermidis* [29].

Obiecującą propozycją jest test opracowany przez Tolo i wsp. [82], który oparty jest na polimorfizmie pojedynczego nukleotydu w rozpatrywanych sześciu klastrach genetycznych. Według autorów test pozwala na określenie szpitalnego bądź pozaszpitalnego źródła pochodzenia izolatu z trafnością 80% oraz określenia zakażenia czy kontaminacji z trafnością 45%. Wyniki są porównywalne do uzyskiwanych dzięki łącznemu testowaniu pięciu markerów genetycznych: *icaA*, *IS256*, *sesD* (*bhp*), *mecA* i ACME [82].

8. Podsumowanie

Bakterie *S. epidermidis* są obecnie jednym z ważniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych. Patogenne szpitalne szczepy *S. epidermidis* wytwarzają biofilm oraz wykazują oporność na wiele antybiotyków.

Biorąc pod uwagę dużą zmienność genetyczną tych bakterii, ich oporność na antybiotyki, doskonałe przystosowanie do środowiska szpitalnego oraz łatwość rozprzestrzeniania można spodziewać się, że potencjał *S. epidermidis* jako mikroorganizmu odpowiedzialnego za wywoływanie zakażeń szpitalnych nie jest wyczerpany. Aby przeciwdziałać dalszej ewolucji *S. epidermidis* w tym niekorzystnym kierunku, należy dołożyć wszelkich starań by zapobiec narastaniu oporności na antybiotyki i rozprzestrzenianiu patogennych szczepów szpitalnych.

Piśmiennictwo

1. Aanensen D.M., Spratt B.G.: The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* **1**, DOI: 10.1093/nar/gki415 (2005)
2. Archer G.L.: Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **21**, 133–138 (1988)
3. Asaad A.M., Qureshib M.A., Hasanc S.M.: Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolates from nosocomial bloodstream infections. *Infect. Dis.* **48**, 356–360 (2016)
4. Barbier F., Ruimy R. i wsp.: Methicillin-resistant coagulase--negative staphylococci in the community: high homology of SCC*mec* IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **15**, 270–281 (2010)
5. Bates D.W., Goldman L., Lee T.H.: Contaminant blood cultures and resource utilization. The true consequences of false-positive results. *JAMA*, **265**, 365–369 (1991)
6. Bathoorn E., Hetem D.J., Alphenaar J., Kusters J.G., Bonten M.J. Emergence of high-level mupirocin resistance in coagulase--negative staphylococci associated with increased short-term mupirocin use. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2947–2950 (2012)
7. Bearman G.M., Wenzel R.P.: Bacteremias: a leading cause of death. *Arch. Med. Res.* **36**, 646–659 (2005)
8. Becker K., Heilmann C., Peters G.: Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014)
9. Biavasco, F., Vignaroli, C., Varaldo, P.E.: Glycopeptide resistance in coagulase negative staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 403–417 (2000)
10. Boghossian N.S., Higgins R.D. i wsp.: Late-onset sepsis invery low birth weight infants from singleton and multiple-gestation births. *J. Pediatr*. **162**, 1120–1124 (2013)
11. Cerca N., Jefferson K.K., Oliveira R., Pier G.B., Azeredo J.: Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. *Infect. Immun.* **74**, 4849–4855 (2006)
12. Cerca N., Martins S., Cerca F., Jefferson K.K., Pier G.B., Oliveira R., Azeredo J.: Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm *versus* planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *J. Antimicrob. Chemoth.* **56**, 331–336 (2005)
13. Cherifi S., Byl B., Deplano A., Nonhoff C., Denis O., Hallin M.: Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1541–1547 (2013)
14. Chong J., Quach C., Blanchard A.C., Poliquin P.G., Golding G.R., Laferrière C., Lévesque S.: Molecular epidemiology of a vancomycin-intermediate heteroresistant *Staphylococcus epidermidis* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Antimicrob. Agents Chemother*. **60**, 5673–5681 (2016)
15. Chu V.H., Fowler V.G.Jr. i wsp.: Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 232–242 (2008)
16. Conlan S., Segre J.A. i wsp.: *Staphylococcus epidermidis* pan--genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biol.* **13**, DOI: 10.1186/gb-2012-13-7-r64 (2012)
17. Costa S.S., Viveiros M., Pomba C., Couto I.: Active antimicrobial efflux in Staphylococcus epidermidis: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen. J. Antimicrob. Chemot. **73**, 320–324 (2018)
18. De N., Godlove M.: Prevalence of *S. aureus* and *S. epidermidis* among patients with indwelling catheters and their antibiogram using some commonly used antibiotics. *J. Am. Sci.* **6**, 515–520 (2010)
19. Denton C., Pappas E.G., Uricchio J.F., Goldberg H., Likoff W.: Bacterial endocarditis following cardiac surgery. *Circulation,* **15**, 525–531 (1957)
20. Do G., Jarvis W.R. i wsp.: The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **20**, 167–170 (1999)
21. Domingo P., Fontanet A.: Management of complications associated with totally implantable ports in patients with AIDS. *AIDS Patient Care STDS*, **15**: 7–13 (2001)

22. Donker T., Wallinga J., Grundmann H.: Dispersal of antibiotic--resistant high risk clones by hospital networks: changing the patient direction can make all the difference. *J. Hosp. Infect*. **86**, 34–41 (2014)
23. Du X., Zhu Y., Song Y., Li T., Luo T., Sun G., Yang C., Cao C., Lu Y., Li M.: Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. *Plos One*, **8**, e62742 (2013)
24. Duah M.: Daptomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* native-valve endocarditis: a case report. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*. **9**, DOI: 10.1186/1476-0711-9-9 (2010)
25. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011–2012. (2013) https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/point-prevalence-survey-healthcare-associated-infections-and-antimicrobial-use-0 (26.02.2018)
26. Farrell D.J., Mendes R.E., Ross J.E., Jones R.N.: Linezolid surveillance program results for 2008 (LEADER Program for 2008). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. **65**, 392–403 (2009)
27. Franca A., Carvalhais V., Vilanova M., Pier G.B., Cerca N.: Characterization of an *in vitro* fed-batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms. *AMB Express,* **6**, DOI: 10.1186/s13568-016-0197-9 (2016)
28. Frebourg N.B., Lefebvre S., Baert S., Lemeland J.F.: PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Clin. Microbiol*. **38**, 877–880 (2000)
29. Galdbart J.O., Allignet J., Tung H.S., Ryde`n C., El Solh N.: Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J. Infecti. Dis.* **182**, 351–355 (2000)
30. Gatermann S.G., Koschinski T., Friedrich S.: Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 777–781 (2007)
31. Ghassemi A., Farhangi H., Badiee Z., Banihashem A., Mosaddegh M.R.: Evaluation of nosocomial infection in patients at hematology-oncology ward of Dr. Sheikh children's hospital. *Iran. J. Ped. Hematol. Oncol.* **5**, 179–185 (2015)
32. Gill S.R., Fraser C.M. i wsp.: Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm--producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **187**, 2426–2438 (2005)
33. Grice E.A., Segre J.A. i wsp.: Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, **29**, 1190–1192 (2009)
34. Hellmark B., Unemo M., Nilsdotter-Augustinsson A., Söderquist B.: Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections with special focus on rifampicin and variability of the *rpoB* gene. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 238–244 (2009)
35. Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., Horan T.C., Sievert D.M., Pollock D.A., Fridkin S.K.: Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. **29**, 996–1011 (2008)
36. Hira V., Sluijter M., Goessens W.H., Ott A., de Groot R., Hermans P.W., Kornelisse R.F.: Coagulase-negative staphylococcal skin carriage among neonatal intensive care unit personnel: from population to infection. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3876–3881 (2010)
37. Hovelius B., Mardh P.A.: *Staphylococcus saprophyticus* as a common cause of urinary tract infections. *Rev. Infect. Dis.* 6, 328–337 (1984)
38. Hu H., Johani K., Gosbell I.B., Jacombs A.S., Almatroudi A., Whiteley G.S., Deva A.K., Jensen S., Vickery K.: Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug--resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. *J. Hosp. Infect.* **91**, 35–44 (2015)
39. Hwang J.H., Choi C.W., Chang Y.S., Choe Y. H., Park W.S., Shin S.M., Lee M., Lee S.I.: The efficacy of clinical strategies to reduce nosocomial sepsis in extremely low birth weight infants. *J. Korean Med. Sci.* **20**, 177–181 (2005)
40. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC): Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 4961–4967 (2009)
41. Kelly S., Collins J., Maguire M., Gowing C., Flanagan M., Donnelly M., Murphy P.G.: An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 901–907 (2008)
42. Kocianova S., Vuong C., Yao Y., Voyich J.M., Fischer E.R., DeLeo F.R., Otto M.: Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of S*taphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Invest*. **115**, 688–694 (2005)
43. Kozitskaya S., Cho S.H., Dietrich K., Marre R., Naber K., Ziebuhr W.: The bacterial insertion sequence element IS*256* occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect. Immun.* **72**, 1210–1215 (2004)
44. Kübler A., Mayzner-Zawadzka E., Durek G., Gaszyński W., Nestorowicz A., Karpel E.: Prevalence and incidence of severe sepsis in intensive therapy units in Poland. *Anest. Int. Ther.* **39**, 90–94 (2007)
45. Kurtz S.M., Lau E., Watson H., Schmier J.K., Parvizi J.: Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J. Arthroplasty*, **27**, 61−65 (2012)
46. Lee J.Y.H., Monk I.R., Pidot S.J., Singh S., Chua K.Y.L., Seemann T., Stinear T.P., Howden B.P.: Functional analysis of the first complete genome sequence of a multidrug resistant sequence type 2 *Staphylococcus epidermidis*. *Microb. Genom.* **2**(9): e000077 DOI:10.1099/mgen.0.000077 (2016)
47. Luk A., Kim M.L., Ross H.J., Rao V., David T.E., Butany J: Native and prosthetic valve infective endocarditis: clinicopathologic correlation and review of the literature. *Malays. J. Pathol.* **36**, 71–81 (2014)
48. McCann M.T., Gilmore B.F., Gorman S.P.: *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm. Pharmacol.* **60**, 1551–1571 (2008)
49. McTaggart L.A., Rigby R.C., Elliott T.S.: The pathogenesis of urinary tract infections associated with *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* and *S. epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* **32**, 135–141 (1990)
50. Mendes R.E., Deshpande L.M., Costello A.J., Farrell D.J.: Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4656–4661 (2012)
51. Mermel L.A., Allon M., Bouza E., Craven D.E., Flynn P., O'Grady N.P., Raad I.I., Rijnders B.J., Sherertz R.J., Warren D.K.: Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1–45 (2009)
52. Miller J.J., Scott I.U., Flynn H.W.J., Smiddy W.E., Newton J.: Acute-onset endophthalmitis after cataract surgery (2000–2004): incidence, clinical settings, and visual acuity outcomes after treatment. *Am. J. Ophthalmol.* **139**, 983–987 (2005)

53. Miragaia M., Carriço J.A., Thomas J.C., Couto I., Enright M.C., de Lencastre H.: Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 118–129 (2008)
54. Miragaia M., Thomas J.C., Couto I., Enright M.C., de Lencastre H.: Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* **189**, 2540–2552 (2007)
55. Moloney T.P., Park J.: Microbiological isolates and antibiotic sensitivities in culture-proven endophthalmitis: a 15-year review. *Br. J. Ophthalmol*. **98**, 1492–1497 (2014)
56. Monsen T., Karlsson C., Wiström J.: Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **26**, 76–80 (2005)
57. Montanaro L., Speziale P., Campoccia D., Ravaioli S., Cangini I., Pietrocola G., Giannini S., Arciola C.: Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* **6**, 1329–1349 (2011)
58. Morris S., Gould K., Ferguson L.P.: The use of daptomycin to treat methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis bacteremia in a critically III child with renal failure. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* **22**, 300–303 (2017)
59. Najar-Peerayeh S., Moghadas A.J., Behmanesh M.: Antibiotic susceptibility and *mecA* frequency in *Staphylococcus epidermidis*, isolated from Intensive Care Unit patients. *Jundishapur J. Microbiol.* **7**, e11188, DOI: 10.5812/jjm.11188 (2014)
60. Nikbakht M., Nahaei M.R., Akhi M.T., Asgharzadeh M., Nikvash S.: Molecular fingerprinting of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients and staff of two Iranian hospitals. *J. Hosp. Infect.* **69**, 46–55 (2008)
61. NPOA – Narodowy Program Ochrony Antybiotyków.: Definicje zakażeń związanych z opieką zdrowotną (HAI) obowiązujące od 1 stycznia 2016 r. wg ECDC. (2016), http://www.antybiotyki.edu.pl/zakazenia-szpitalne.php (26.02.2018)
62. O'Callaghan R.J.: The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* eye infections. *Pathogens*, **7**, DOI: 10.3390/pathogens7010009 (2018)
63. Otto M.: *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 555–567 (2009)
64. Parte A.C.: LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res.* **42**, DOI: 10.1093/nar/gkt1111(2014)
65. Pien B.C., Sundaram P., Raoof N., Costa S.F., Mirrett S., Woods C.W., Reller L.B., Weinstein M.P.: The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. *Am. J. Med.* **123**, 819–828 (2010)
66. Pinheiro L., Brito C.I., Pereira V.C., Oliveira A., Bartolomeu A.R., Camargo C.H.: Susceptibility profile of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from blood cultures to vancomycin and novel antimicrobial drugs over a period of 12 years. *Microb. Drug Resist*. **22**, 283–293 (2016)
67. Pournaras S., Ntokou E., Zarkotou O., Ranellou K., Themeli-Digalaki K., Stathopoulos C., Tsakris A.: Linezolid dependence in *Staphylococcus epidermidis* bloodstream isolates. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 129–132 (2013)
68. Qazi S.A., Stoll B.J.: Neonatal sepsis: a major global public health challenge. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **28**, DOI: 10.1097/INF.0b013e31819587a9 (2009)
69. Relhan N., Albini T., Pathengay A., Flynn H.W.: Bilateral endogenous endophthalmitis caused by vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a neonate. *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* **5,** DOI: 10.1186/s12348-015-0039-y (2015)
70. Ribeiro M., Monteiro F.J., Ferraz M.P.: Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter.* **2**, 176–194 (2012)
71. Rolo J., de Lencastre H., Miragaia M.: Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification of SCC*mec*. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1333–1341 (2012)
72. Rosenthal V.D, Graves N. i wsp.: Time-dependent analysis of length of stay and mortality due to urinary tract infections in ten developing countries: INICC findings. *J. Infect.* **62**, 136–141 (2011)
73. Rotger M., Trampuz A., Piper K.E., Steckelberg J.M., Patel R.: Phenotypic and genotypic mupirocin resistance among staphylococci causing prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4266–4268 (2005)
74. Rupp M.E., Archer G.L.: Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 231–245 (1994)
75. Salih. L., Tevell S., Mansson E., Nilsdotter-Augustinsson A., Hellmark B., Soderquist B.: *Staphylococcus epidermidis* isolates from nares and prosthetic joint infections are mupirocin susceptible. *J. Bone Joint Infect.* **3**, DOI: 10.7150/jbji.22459 (2018)
76. Siddiq M., Darouiche R.O.: New strategies to prevent catheter-associated urinary tract infections. *Nat. Rev. Urol.* **9**, 305–314 (2012)
77. Sieradzki K., Villari P., Tomasz A.: Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 100–107 (1998)
78. Söderquist B., Andersson M., Nilsson M., Nilsdotter-Augustinsson A., Persson L., Friberg O., Jacobsson S.: *Staphylococcus epidermidis* surface protein I (SesI): a marker of the invasive capacity of *S. epidermidis*? *J. Med. Microbiol*. **58**, 1395–1397 (2009)
79. Taylor S.D., Palmer M.: The action mechanism of daptomycin. *Bioorg. Med. Chem*. **15**, 6253–6268 (2016)
80. Thomas J.C., Vargas M.R., Miragaia M., Peacock S.J., Archer G.L., Enright M.C.: Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 616–619 (2007)
81. Thylefors J.D., Harbarth S., Pittet D.: Increasing bacteremia due to coagulase-negative staphylococci: fiction or reality? *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **19**, 581–589 (1998)
82. Tolo I., Thomas J.C., Fischer R.S.B., Brown E.L., Gray B.M., Robinson D.A.: Do *Staphylococcus epidermidis* genetic clusters predict isolation sources? *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1711–1719 (2016)
83. Trevino M., Martinez-Lamas L., Romero-Jung P.A., Giraldez J.M, Alvarez-Escuder J., Regueir B.J.: Endemic linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a critical care unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 527–533 (2009)
84. Vasudevan R.: Urinary tract infection: an overview of the infection and the associated risk factors. *J. Microbiol. Exp.* **1**, DOI: 10.15406/jmen.2014.01.00008 (2014)
85. von Eiff, C.; Reinert, R.R.; Kresken, M.; Brauers, J.; Hafner, D.: Nationwide German multicenter study on prevalence of antibiotic resistance in staphylococcal bloodstream isolates and comparative in vitro activities of quinupristin dalfopristin. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2819–2823 (2000)
86. Widerström M., Wiström J., Edebro H., Marklund E., Backman M., Lindqvist P., Monsen T.: Colonization of patients, healthcare workers, and the environment with healthcare-associated *Staphylococcus epidermidis* genotypes in an intensive care unit: a prospective observational cohort study. *BMC Infect. Dis.* **16**, DOI: 10.1186/s12879-016-2094-x (2016a)
87. Widerström M.: Significance of *Staphylococcus epidermidis* in health care-associated infections, from contaminant to clinically relevant pathogen: this is a wake-up call! *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1679–1681 (2016b)

88. Widerström M., McCullough C.A., Coombs G.W., Monsen T., Christiansen K.J.: A multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone (ST2) is an ongoing cause of hospital-acquired infection in a Western Australian Hospital. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2147–2151 (2012a)
89. Widerström M., Wiström J., Sjöstedt A., Monsen T.: Coagulase--negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 31, 7–20 (2012b)
90. Widerstrom M., Monsen T., Karlsson C., Edebro H., Johansson A., Wistrom J.: Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in Northern Europe. *Scand. J. Infect. Dis.* **41**, 642–649 (2009)
91. Widerstrom M., Monsen T., Karlsson C., Wistrom J.: Molecular epidemiology of meticillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a Swedish county hospital: evidence of intra- and interhospital clonal spread. *J. Hosp. Infect.* **64**, 177–183 (2006)
92. Wu H., Moser C., Wang H.Z., Høiby N. Song Z.J.: Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci*. **7**, DOI: 10.1038/ijos.2014.65 (2014)
93. Yamada M., Yoshida J., Hatou S., Yoshida T., Minagawa Y.: Mutations in the quinolone resistance determining region in *Staphylococcus epidermidis* recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones. *Br. J. Ophthalmol*. **92**, 848–851 (2008)
94. Yilmaz C, Colak M, Yilmaz B.C. i wsp.: Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J. Bone Joint Surg. Am*. **95**, 117–125 (2013)
95. Zhang Y.Q., Wen Y.M. i wsp.: Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* **49**, 1577–1593 (2003)
96. Ziebuhr W., Hennig S., Eckart M., Kranzler H., Batzilla C., Kozitskaya S.: Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **28**, 14–20 (2006)
97. Ziebuhr W., Heilmann C., Götz F., Meyer P., Wilms K., Straube E., Hacker J.: Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* **65**, 890–896 (1997)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 360–373
http://www.pm.microbiology.pl

SYSTEMY SEKRECJI TYPU VB ORAZ VI JAKO CZYNNIKI KONKURENCJI BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

Dawid Gmiter*, Grzegorz Czerwonka, Wiesław Kaca

Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w sierpniu 2018 r.

Streszczenie: Konkurencja bakteryjna, zdefiniowana jako lokalne oddziaływania, może doprowadzić do koegzystencji konkurentów, samoorganizacji społeczności bakteryjnej lub rozkładu dominacji gatunków w niszach ekologicznych. Bakterie wykształciły wiele mechanizmów komunikacji i konkurencyjności. Dyskryminacja krewniacza pozwala gatunkom na rozróżnienie komórek krewniaczych od niespokrewnionych w środowisku bytowania. System sekrecji typu Vb oraz VI (SSTVb i SSTVI) odgrywają istotną rolę w tym zjawisku. System inhibicji wzrostu zależnej od kontaktu, odkryty w *Escherichia coli*, wykorzystuje białka CdiB/CdiA przynależne do SSTVb, opisywane również jako dwu-partnerski system sekrecji, do inhibicji wzrostu niespokrewnionych szczepów i wymaga kontaktu komórek. Obecność wewnątrzkomórkowej, małej proteiny immunoprotekcyjnej (CdiI) chroni komórki *E. coli* przed autoinhibicją. Inny system konkurencji bakteryjnej, początkowo opisany w procesie nodulacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*, angażuje system sekrecji typu VI. Struktura SSTVI jest bardziej skomplikowana i zawiera w sobie szereg białek homologicznych do ogonka bakteriofagów i białek membranowych budujących rdzeń aparatury (białka Tss). Cześć białek wchodzących w skład SSTVI opisano jako białka akcesoryjne (białka Tag). Ważnymi dla funkcjonowania SSTVI są heksamery Hcp (haemolysin coregulated protein) oraz białka VgrG (valine-glycine repeat G), które odrywają podwójną rolę: białek chaperonowych dla sekrecji toksyn i/lub właściwych toksycznych efektorów. Pomimo znacznych różnic w budowie, oba przedstawione systemy wykazują homologiczną funkcję w zjawisku konkurencji i regulują interakcje społeczności bakteryjnych.

1. Wstęp. 2. Inhibicja wzrostu zależna od kontaktu. 2.1. Budowa białkowej aparatury systemu CDI. 2.2. Efektory systemu CDI. 3. System sekrecji typu VI. 3.1. Budowa systemu sekrecji typu VI. 3.2. Efektory system sekrecji typu VI. 4. Przynależność do systemu polimorficznych toksyn. 5. Znaczenie systemów konkurencji w biologii bakterii. 6. Podsumowanie

TYPE VB AND VI SECRETION SYSTEMS AS COMPETITION AGENTS OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Abstract: Bacterial competition, defined as a local neighbour interaction, can lead to competitors' coexistence, bacterial community self-organization or rearrangement of species dominance structure in ecological niches. Bacteria developed many mechanisms to communicate and compete. Kin discrimination mechanisms in bacterial populations allow species to distinguish a friend from a foe in bacterial environment. Type Vb and VI secretion systems (TVIbSS and TVISS) play a crucial role in this phenomenon. A contact-dependent growth inhibition (CDI), primarily found in *Escherichia coli* strains, utilizes CdiB/CdiA protein of type Vb secretion system, described also as two-partner secretion (TPS) system, to inhibit growth of non-kin strains, where cell contact is required. Presence of an intracellular small immunity protein (CdiI) protects *E. coli* cells from autoinhibition. Other bacterial competition system, involved mainly in the nodulation process of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strain, engages type VI secretion system. The structure of TVISS is more complicated and comprises a series of proteins with structural homology to bacteriophage tail proteins and membrane proteins, which build the core of the system (Tss proteins). Other proteins of the TVISS have been described as associated proteins (Tag proteins). Important proteins for TVISS are also haemolysin coregulated protein (Hcp), which has a hexameric, tubular structure, and VgrG protein (valine-glycine repeat G). VgrG plays a dual role in the process: is a chaperone protein in the secretion of effector toxin or/and is secreted as a toxin itself. Despite the structural differences between these secretion systems, they both show functional homology in the competition phenomenon and govern the social life of bacterial community.

1. Introduction. 2. Contact-dependent growth inhibition. 2.1. Structure of the CDI system. 2.2. Effectors of the CDI system. 3. Type VI secretion system. 3.1. Structure of the type VI secretion system. 3.2. Effectors of the type VI secretion system. 4. Members of the polymorphic toxin system. 5. Role of the competition systems in bacterial biology. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: inhibicja wzrostu zależna od kontaktu, konkurencja bakteryjna, system sekrecji typy Vb, system sekrecji typu VI
Keywords: contact-dependent growth inhibition, bacterial competition, type Vb secretion system, type VI secretion system

1. Wstęp

Bakterie bytują w środowisku w postaci złożonych społeczności, wewnątrz których obserwowane są liczne interakcje – począwszy od współpracy, a kończąc na konkurencji o przestrzeń życiową i dostęp do składników pokarmowych [43, 83, 102]. Najlepiej poznanym przykładem współistnienia mikroorganizmów jest biofilm. Jest to skomplikowana struktura, w której komórki otoczone są macierzą składającą się głównie z polisacharydów, białek i DNA. Macierz biofilmu stanowi barierę ochronną – spowalnia dyfuzję antybiotyków, chroni przed czynnikami fizycznymi oraz zapewnia odpowiednią wilgotność środowiska życia komórek [97]. Na społeczność biofilmu mogą składać się zarówno bakterie należące do jednego gatunku, jak i aglomeraty skupia-

* Autor korespondencyjny: Dawid Gmiter, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce; tel: 41 349 61 22; e-mail: gmiterd@gmail.com

jące organizmy należące do wielu gatunków [84, 119]. Ponadto, biofilm może być tworzony przez mikroorganizmy prokariotyczne i eukariotyczne [13, 14].

Jako zachowanie zaliczane do kooperacji wymienić należy zjawisko tzw. „wyczuwania kworum", czyli Quorum Sensing (QS). Jest to zdolność „komunikowania się" bakterii poprzez sygnałowe cząsteczki chemiczne (autoinduktory). Wzrost stężenia autoinduktorów, w odpowiedzi na rozrastającą się populację drobnoustrojów w biofilmie, powoduje uruchomienie odpowiednich szlaków sygnalizacyjnych, co stanowi podstawę dla kolonizacji przez bakterie kolejnych powierzchni biotycznych i abiotycznych [74, 97].

Bakterie, podobnie jak organizmy wyższe, stale ze sobą konkurują i jak wskazują badania, konkurencja występuje wśród nich częściej niż kooperacja [34]. W niekorzystnym dla siebie środowisku, gdzie dostęp do składników pokarmowych jest utrudniony, drobnoustroje wykorzystują liczne mechanizmy mające zapewnić im przewagę [102]. Konkurencja bakteryjna powiązane może być ze zjawiskiem dyskryminacji krewniaczej (kin discrimination), ponieważ kooperacja populacji bakteryjnej jest pożądana pomiędzy komórkami spokrewnionymi [63]. Termin dyskryminacja krewniacza określa zdolność bakterii do odróżnienia komórek szczepu niespokrewnionego od tych należących do tego samego, lub bardzo blisko spokrewnionego, szczepu i wywołania zmian w funkcjonowaniu niespokrewnionego organizmu [109], takich jak zahamowanie wzrostu rozpełzłego [4] lub inhibicja wzrostu [10]. Ciekawym mechanizmem jest dyskryminacji krewniaczej połączona z konkurencją bakteryjną wymagającą kontaktu komórek poprzez wyspecjalizowane białka budujące dwa systemy sekrecji: system inhibicji wzrostu zależnej od kontaktu (Contact-Dependent Growth Inhibition, CDI) oraz system sekrecji typu VI (Type VI Secretion System, TVISS). Zjawisko to opiera się na eliminacji szczepów niespokrewnionych, tj. wrażliwych na białkowe toksyny transportowane przez powyższe systemy bezpośrednio do wnętrza komórki [63, 116]. W literaturze wymienia się kilka innych przykładów oddziaływań pomiędzy komórkami bakteryjnymi, dla których ważnym czynnikiem jest ich bezpośredni kontakt, m.in.: C-sygnalizacja u *Myxococcus xanthus* lub transport jednoniciowego DNA z enzymem relaksazą związanego kowalencyjnie na końcu 5' poprzez system sekrecji typu IV [21, 52].

2. Inhibicja wzrostu zależna od kontaktu

Termin inhibicja wzrostu zależna od kontaktu (CDI) został przedstawiony przez Aokiego i wsp. w 2005 roku [10]. Odnosi się on do fenomenu wykazywanego przez szczep *Escherichia coli* EC93, który charakteryzuje się zdolnością do zahamowania wzrostu innych szczepów *E. coli* w hodowli płynnej. Zjawisko to warunkowane jest działaniem produktów ekspresji genów operonu *cdiBAI* [10]. Białka CdiA oraz CdiB należą do podklasy b systemu sekrecji typu V (Type Vb Secretion System, TVbSS), określanej również jako dwu-partnerski system sekrecji (Two-Partner secreation System, TPS) [107, 117]. System sekrecji bakterii Gram-ujemnych klasyfikowany jako system typu V składa się z pięciu podklas: typy od Va do Ve. Białka należące do tych podklas są do siebie strukturalnie podobne, wszystkie posiadają białkowy kanał transportujący o strukturze β-baryłki [107].

Geny operonu *cdiBAI* szczepu *E. coli* EC93 ulegają ekspresji w sposób konstytutywny. System ten działa z wysoką wydajnością – pojedyncza komórka dominującego szczepu jest zdolna do odwracalnego zahamowania wzrostu nawet setek komórek szczepów niespokrewnionych znajdujących się w jej otoczeniu [10, 12]. Operon *cdiBAI*, po wprowadzeniu do laboratoryjnego szczepu *E. coli* K-12, zmienia fenotyp CDI– na CDI+ [10].

2.1 Budowa białkowej aparatury systemu CDI

Pierwsze z białek kodowanych przez operon (CdiB) jest zewnątrzkomórkową proteiną o wielkości ok. 64,5 kDa. Przyjmuje ono strukturę β-baryłki, a jego funkcją jest sekrecja i prezentowanie egzoproteiny CdiA na powierzchni komórki atakującej bakterii. Toksyną antybakteryjną jest białko CdiA. Jest to białko wielkości ok. 319 kDa. Białko CdiA posiada na swoim końcu karboksylowym domenę stanowiącą właściwą toksynę – region CdiA-CT (C-terminal CdiA) [11]. Koniec aminowy białka syntetyzowanego przez różne szczepy *E. coli*, o długości ok. 2800 aminokwasów, wykazuje wysoki stopień podobieństwa filogenetycznego, natomiast region CdiA-CT (ok. 250–350 aminokwasów) jest zróżnicowany pomiędzy szczepami [7]. Toksyna CdiA-CT wykazuje najczęściej aktywność nukleolityczną. Region aminowy i karboksylowy oddzielone są od siebie konserwatywnym motywem VE(NN). Immunoproteina CdiI warunkuje ochronę przed autoinhibicją. Rozpoznaje ona specyficzną dla siebie toksynę CdiA i wiążąc się do niej, hamuje jej działanie [11, 42]. W badaniach Tana i wsp. przedstawiono strukturę białka CdiI szczepu *Neisseria meningitidis* MC58. Białko to posiada strukturę homologiczną do białek wiążących RNA należących do rodziny Whirly. Zasugerowano również, że działanie immunoprotekcyjne białka CdiI może wynikać z ograniczenia dostępu toksyny CdiA – rybonukleazy EndoU – do cząsteczki RNA [103]. Wyniki badań wskazują, że wiązanie się ze sobą białek CdiA oraz CdiI stabilizowane jest przez różne mechanizmy: m.in. przez β-augmentację, w przebiegu której toksyna wydłuża domenę β-spinki by utworzyć antyrównoległą β-harmonijkę z fragmentem białka

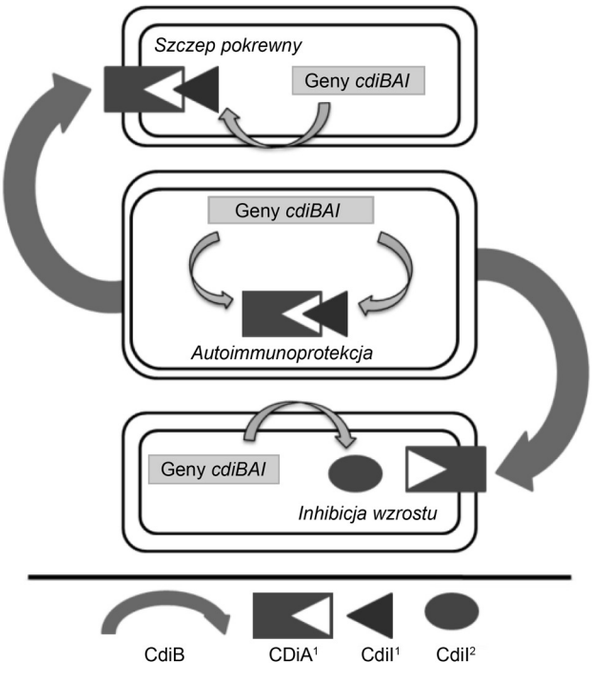
immunoprotekcyjnego [72, 73] lub komplementarność wynikającą z kształtu i ładunku [72].

System CDI wykorzystywany przez szczepy *E. coli* nazwano systemem typu *E. coli* (*E. coli* – type CDI). Uogólniony schemat działania tego systemu został przedstawiony na rycinie 1. Identyczne lub bardzo podobne systemy występują również w innych szczepach patogennych. Między innymi wymieć można szczep *Dickeya dadantii* 3937 [8] oraz gatunki *Enterobacter cloacae* i *N. meningitidis* [46]. Również rodzaj *Pseudomonas* posiada w swoim genomie operon genów odpowiadający za zahamowanie wzrostu uwarunkowane kontaktem typu *E. coli*. W badaniach Mercy'ego i wsp. na modelowym szczepie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 zaobserwowano, że system ten odgrywa rolę w procesie adhezji, tworzeniu biofilmu oraz konkurencji. Unikalność systemu CDI mikroorganizmów rodzaju *Pseudomonas* wynika ze zmienności motywów oddzielających końce aminowy i karboksylowy toksycznego białka CdiA. Analiza bioinformatyczna wykazała, że możliwe jest wyodrębnienie pięciu klas tego motywu: WVHN, VE(NN), LYVT, DAMV oraz NEALV [71].

System CDI charakterystyczny dla rodzajów *Burkholderia*, *Ralstonia* oraz *Cupriavidus* został nazwany terminem CDI typu *Burkholderia* (*Burkholderia* – type CDI). Rodzaj *Burkholderia* posiada w genomie operon składający się z genów *bcpAIOB* [77]. Poza białkami typowymi dla CDI (BcpA – CdiA, BcpB – CdiB oraz BcpI – CdiI), operon ten koduje dodatkową, małą lipoproteinę BcpO. Jej funkcja nie została w pełni wyjaśniona, jednak jest ona wymagana do sekrecji toksyny BcpA przez szczep *Burkholderia thailandensis* E264. Dodatkową różnicą jest występowanie motywu NxxLYN zamiast VE(NN) w toksynie BcpA, a sama toksyna posiada aktywność RNazy [6, 53].

Innym typem systemu CDI jest ten obecny u bakterii *Xenorhabdus doucetiae,* nazwany typem *cdiBCAI* (cdiBCAI-type). Analiza porównawcza *in silico* wskazuje, że taki operon często występuje wśród bakterii środowiskowych. Charakterystyczny dla tego typu gen *cdiC* koduje homolog białka C (należącego do acetylotransferaz) pełniącego funkcję aktywatora toksyny. Operon *cdiBCAI* koduje toksynę CdiA, w której występuje konserwatywny motyw VE(NN) [78].

Należy odnotować fakt, że w genomach bakterii posiadających system CDI typu *E. coli* często występują powtarzające się sekwencje nazwane fragmentami sierocymi (orphan). Kodują one toksyny CdiA-CT oraz protekcyjne polipeptydy CdiI, a ich funkcja i znaczenie nie zostały wyjaśnione. Postulowana jest hipoteza, że mogą stanowić „arsenał" zastępczy aktywowany w specyficznych warunkach. Dotyczy to w szczególności genów *cdiI*, gdyż ich sekwencje nukleotydowe wydają się kodować w pełni funkcjonale białka [11].



Ryc. 1. Schemat działania systemu CDI typu *E. coli*

Białko CdiB umożliwia wprowadzenie toksyny CdiA[1] do wnętrza komórki atakowanej. Tam, jeśli toksyna rozpoznana zostanie przez białko immunoprotekcyjne CdiI[1], następuje jej inaktywacja, co świadczy o pokrewieństwie komórek. W przypadku braku pokrewieństwa, immunoproteina CdiI[2] nie jest w stanie związać toksyny i dochodzi do zahamowania wzrostu. Równocześnie, powstanie kompleksu pomiędzy białkami CdiA[1] oraz CdiI[1] zapewnia komórce autoimmunoprotekcję.

2.2. Efektory systemu CDI

Efektory systemu CDI charakteryzują się zróżnicowanym mechanizmem aktywności antybakteryjnej. W przypadku szczepu *E. coli* EC93, CdiA najprawdopodobniej wykazuje zdolność do tworzenia porów w ścianie komórkowej atakowanej bakterii [47]. Z kolei inne bakterie produkują toksyny CdiA-CT, które najczęściej posiadają aktywność nukleolityczną [118]. Dokładniejsza analiza regionu odpowiedzialnego za toksyczność wskazuje, że można go podzielić na dwie części: koniec karboksylowy, będący enzymem nukleolitycznym – toksyną, która ulega „odcięciu" przed translokacją – oraz koniec aminowy grający kluczową rolę w transporcie nukleazy [111, 117]. Toksyna CdiA-CT syntetyzowana przez *E. cloacae* degraduje rybosomalny RNA [18]. Natomiast toksyna opisana dla szczepu *E. coli* 536 (UPEC536) jest tRNazą, która wymaga aktywacji poprzez obecność sulfahydralazy *O*-acetylseryny A (CysK). Jest to pierwsza poznana toksyna, do aktywności której wymagany jest dodatkowy czynnik [30]. Nowsze wyniki badań pokazują, że aktywność toksyn CDI może być również regulowana innymi czynnikami. Przykładem może być CdiA syntetyzowana przez szczep *E. coli* EC869. Szczep ten produkuje CdiA o aktywności tRNazy, dla aktywacji

której niezbędny jest czynnik elongacyjny Ts (Elongation Factor Ts, EF-Ts). Ponadto, toksyna ta wiąże się do czynnika elongacyjnego Tu (EF-Tu). Jest ona tRNazą GTP-zależną, co jak wskazują autorzy, sugeruje, że tRNA jest degradowany przez powyższą toksynę jedynie w obecności kompleksu GTP+EF-Tu-tRNA [47]. Batot i wsp. zaprezentowali strukturę kryształu kompleksu toksyny CdiA oraz białka immunoprotekcyjnego pochodzącego ze *Yersinia kristensenii*. Toksynę produkowaną przez powyższą bakterię zakwalifikowano do superrodziny RNaz A [16]. Tymczasem CdiA syntetyzowana przez *Xenorhabdus doucetiae* jest Mg^{2+}-zależną DNazą [78]. Również CdiA opisane u *D. dadantii* [111] oraz toksyna CdiA-CT0o$_{11}$ syntetyzowana przez szczep *E. coli* EC869 [72] są DNazami. W tym drugim przypadku mamy do czynienia z DNazą zależną od Zn^{2+} [72].

Mechanizm działania systemu CDI polega na zdolności białka CdiA do wydłużenia się na odległość kilkuset Å, a następnie związaniu się do atakowanej komórki przez oddziaływanie z jej zewnątrzkomórkowym receptorem. Najwcześniejsze badania wykazały, że receptorem takim jest białko BamA (znane również jako YaeT lub Omp85) [9]. W transporcie toksyny uczestniczy również AcrB, które jest elementem błony wewnętrznej i składnikiem pompy „efflux" gwarantującej wielolekooporność [9]. Transport toksyny poprzez błonę zewnętrzną komórki zachodzi swobodnie, natomiast jej translokacja do cytoplazmy wymaga dostarczenia energii [85]. Wykazano, że aktywności inhibicyjna systemu CDI *E. coli* skierowana jest jedynie względem szczepów należących do gatunku *E. coli*, które nie są w stanie zablokować działania toksyny przez białko CdiI (szczepy niespokrewnione). Tymczasem konkurencja międzygatunkowa nie jest uwarunkowana tym mechanizmem. Szczep *E. coli* EC93 nie wywołuje efektu hamującego wzrost względem innych *γ*-proteobakerii, w tym m.in.: *Salmonella enterica* serowar Typhimurium, *Citrobacter freundii* lub *Proteus mirabilis*. Może to wynikać z polimorfizmów występujących w 6 i 7 zewnątrzkomórkowej pętli receptora BamA [89]. Co interesujące, białka CDI pośredniczą również w niezależnej od BamA agregacji komórek *E. coli*. Wynika to z oddziaływań pomiędzy homologicznymi białkami CdiA, ponieważ do agregacji komórek niezbędna jest ekspresja tego białka [88]. W najnowszych badaniach wykazano, że białka CdiA szczepów *E. coli* można podzielić na 3 klasy, które charakteryzują się powinowactwem do różnych powierzchniowych receptorów: 1) klasa pierwsza to białka CdiA homologiczne do tych, które są syntetyzowane przez *E. coli* EC93, a które jako receptor wykorzystują białko BamA, 2) do klasy drugiej zaliczyć można białka, które jako receptor rozpoznają heteromeryczne poryny OmpC-OmpF, 3) do efektorów klasy trzeciej zalicza się białka CdiA rozpoznające transporter nukleozydów Tsx. Specyficzność względem rozpoznawanych receptorów jest determinowana przez region CdiA długości ok. 300 aminokwasów zlokalizowany pomiędzy regionami powtórzeń peptydowych FHI-1 oraz FHI-2. Region ten charakteryzuje się podobieństwem w 24–27% pomiędzy poszczególnymi klasami oraz posiada konserwatywny centralny element FHI-1 [19, 87]. Bardzo nietypowy system transportu CdiA-CT został opisany dla szczepu *E. coli* 536, w przypadku którego koniec N w domenie CdiA-CT oddziałuje z fimbrią płciową F [17]. Wykazano również, że w rodzaju *Burkholderia* pętle 6 i 7 w białkowym receptorze BamA różnią się znacząco w porównaniu do *E. coli*, a możliwym receptorem w tym systemie jest lipopolisacharyd (LPS) [53].

3. System sekrecji typu VI

System sekrecji typu VI (SSTVI) jest białkową aparaturą odpowiedzialną za sekrecję toksyn białkowych przez bakterie Gram-ujemne [95]. Jak podaje Records (2011), pierwsze informacje dotyczące tego systemu pochodzą z lat 70., kiedy to Roest wraz ze wsp. zidentyfikowali w genomie *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* zespół genów odpowiadających za zahamowanie zdolności do efektywnego powstawania brodawek na korzeniach grochu. Geny te określono terminem *imp* (impaired in nodulation). Ich sekwencje nukleotydowe nie wykazywały homologii do znanych w tamtym okresie genów. W roku 2003 analiza supernatantu z hodowli *R. leguminosarum* pozwoliła wysnuć wniosek, że gen *impJ* jest niezbędny do sekrecji białka RbsB – proteiny wielkości 27 kDa posiadającej aminokwasowe sekwencje sygnałowe na swoim końcu aminowym. Wkrótce potem podobne obserwacje poczyniono dla innych organizmów, m.in. *Vibrio cholerae* i *P. aeruginosa* oraz patogennej dla ryb bakterii *Edwardsiella tarda* [82].

3.1. Budowa systemu sekrecji typu VI

System sekrecji typu VI charakteryzuje się bardziej złożoną budową w porównaniu do systemu sekrecji typu V [40]. Operon kodujący aparat sekrecji SSTVI w zależności od gatunku może składać się z różnej liczby genów. Podstawowy zestaw białek, określany jako komponent rdzeniowe, kodowany jest przez trzynaście genów. Białka te są wymagane do powstania funkcjonalnego systemu. Poza komponentem rdzeniowym, operon SSTVI często wyposażony jest w dodatkowe geny kodujące białka pomocnicze, które mogę pełnić 3 podstawowe funkcje: 1) są składnikami niezbędnymi do właściwej syntezy aparatu sekrecyjnego SSTVI, 2) są składnikami regulującymi – działającymi na etapie transkrypcji lub posttranskrypcyjnie – ekspresję genów

lub aktywność SSTVI oraz 3) są efektorami SSTVI lub białkami immunoprotekcyjnymi [29, 123].

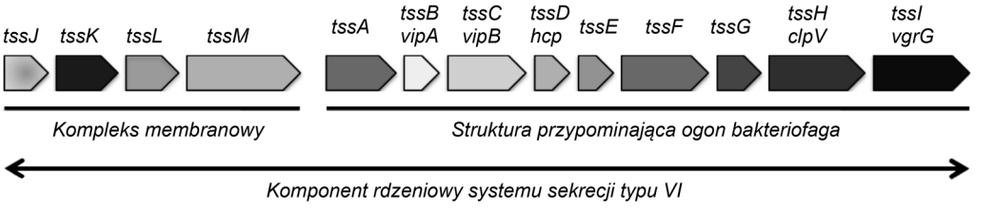
Białka tworzące główny rdzeń (core) SSTVI określa się terminem Tss (Type six secretion), natomiast dla podjednostek akcesoryjnych wykorzystano termin Tag (Type six associated gene) [90]. Geny komponentu rdzeniowego (*TssA-M*) odnajduje się w genomach 25% wszystkich znanych bakterii Gram-ujemnych, ze szczególnym uwzględnieniem proteobakterii. Loci genów SSTVI mogą tworzyć dodatkowe filogenetyczne sub-klasy. Wyodrębniono klaster występujący w genomach proteobakterii ($TVIS^{I}$), klaster charakterystyczny dla rodzaju *Francisella* ($TVIS^{II}$) oraz typu Bacterioidetes ($TVIS^{III}$). Geny *tssE*, *tssG*, *tssJ* i *tssH* nie posiadają homologów w $TVIS^{II}$, natomiast w $TVIS^{III}$ nie występują odpowiedniki *tssA*, *tssJ*, *tssM* i *tssL*. Najlepiej scharakteryzowanym jest klaster typu $TVIS^{I}$ [55]. Geny *tssA-M* dodatkowo dzieli się na następujące grupy: pierwsza (*tssA-I*) koduje białka tworzące strukturę podobną do ogonka bakteriofaga wraz ze strukturą przypominającą płytkę podstawną. Odpowiada ona za wprowadzenie efektora do zaatakowanej komórki. Drugą grupą są białka kodowane przez geny *tssI-M*, te budują podstawowy kompleks błonowy [20, 123] (Ryc. 2).

Jedną ze składowych aparatury SSTVI wchodzących w skład struktury przypominającej ogonek bakteriofaga jest białko TssD określane również jako Hcp (Haemolysin coregulated protein). Białko to zostało opisane po raz pierwszy w 1996 roku, a brak sekwencji sygnałowych w jego strukturze pozwolił na zaproponowanie nowego mechanizmu sekrecji protein [20, 82]. Sekrecja białka Hcp zależna jest od pozostałych białek kodowanych przez geny SSTVI. Białko Hcp tworzy heksametryczną strukturę przyjmująca pierścień o średnicy wewnętrznej równej 4,0 nm oraz zewnętrznej równej 8,5 nm [82]. Heksametry Hcp posiadają zdolność do tworzenia struktur przypominających nanotuby, poprzez które białka efektorowe SSTVI dostarczane są do wnętrza atakowanej komórki. Nanotuba stanowi również ważne białko opiekuńcze dla efektorów SSTVI, zapewniając ochronę przed degradacją [90].

Białka Hcp stanowią środek transportu toksyn i jednocześnie same ulegają sekrecji do wnętrza atakowanej komórki. Dzięki temu w wielu przypadkach wykazują dodatkowe funkcje biologiczne [79, 82], m.in. mogą stanowić białka efektorowe [90]. Nanotuby składające się z heksametrów są strukturalnie podobne do głównych białek ogonka bakteriofaga λ, a ich wewnętrzne i zewnętrze średnice są niemalże identyczne jak tuba ogonka u faga T4. Hcp wykazują również podobieństwo sekwencji aminokwasowej do produktu genu 19 (gene product 19, gp19) faga T4 [58]. Białka gp19 polimeryzując tworzą kanał, przez który bakteriofag dostarcza swoje DNA do wnętrza komórki bakteryjnej [24]. Podobnie wewnętrzny pierścień heksametrów Hcp wiąże białka efektorowe SSTVI [114].

Jak wspomniano powyżej, białka Hcp nie stanowią jedynie elementu budującego aparat systemu sekrecji typu VI, ale są również wydzielane przez wszystkie bakterie posiadające SSTVI do wnętrza komórki atakowanej [80]. Z jednej strony białka Hcp pełnią jedynie funkcje receptorów i białek opiekuńczych dla toksycznych produktów operonów. Taki mechanizm obserwowany jest m.in.: w przypadku *P. aeruginosa* i białka Hcp kodowanych przez geny znajdujące się w obrębie pierwszej genomowej wyspy HSI. *P. aeruginosa* posiada trzy takie wyspy, których geny kodują białka Hcp ulegające sekrecji (Hcp secretion island I, HSI-I) i umożliwiają sekrecję przynajmniej trzech toksycznych białek efektorowych określanych jako Tse1-3 (Type VI Secretion Exportem 1–3) [100]. Z drugiej strony, wiele bakterii, np. należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, posiada w swoim genomie geny kodujące białka Hcp będące w fuzji z toksyczną domeną znajdująca się na ich końcu C (Hcps with C-terminal Extension Toxins, Hcp-ET). Takiego typu toksyny nazwano „evolved" Hcp („przedłużonymi" Hcp) i przypisuje im się m.in.: aktywność DNazy lub fosfolipazy [64].

System sekrecji typu VI angażuje również struktury o dużym podobieństwie do struktur charakterystycznych dla ogonków bakteriofagów takich jak białka gp18, które stanowią osłonę dla białek gp19. Białka te kurcząc się umożliwiają wysunięcie się tuby ogonka i wprowadzenie DNA faga do komórki atakowanej bakterii [24]. Strukturami systemu sekrecji typu VI posiadającymi wysokie podobieństwo do osłonki ogonka fagowego są struktury tworzone przez białka VipA oraz VipB (TssB oraz TssC) [101]. Struktura powstająca z białek VipA/B ma średnicę rzędu 10 nm, co umożliwia ukrycie się w niej nanotuby Hcp [82]. Struktura VipA/B umożliwia nanotubie Hcp przebicie się przez błonę zaatakowanej komórki. Struktura VipA/VipB



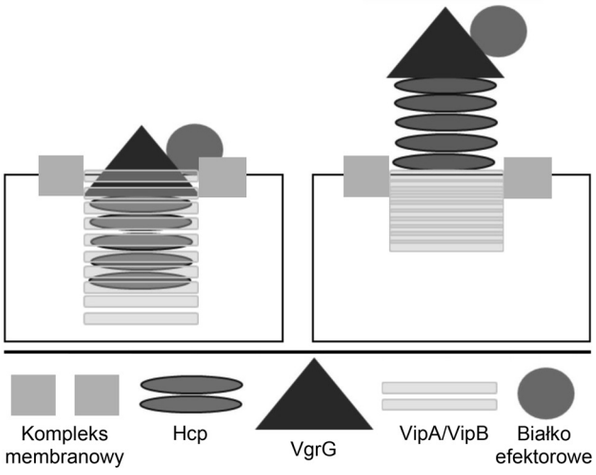
Ryc. 2. Klaster 13 genów wschodzących w skład komponentu rdzeniowego systemu sekrecji typu VI

ulega rozpadowi z udziałem białka ClpV (kodowanego przez gen *tssH*). Białko to wykazuje funkcję ATPazy AAA+ (ATPase Associated with diverse cellular Activities, ATPaza związana ze zróżnicowaną aktywnością komórkową) [23, 15]. Jak wskazują Bröms wraz ze wsp. (2013) oddziaływania pomiędzy białkami VipA oraz VipB umożliwiające powstanie funkcjonalnej osłonki dla nanotuby Hcp odgrywają kluczową rolę w aktywności systemu sekrecji typu VI [23].

Kolejnym ważnym elementem systemu sekrecji typu VI składającym się na strukturę przypominającą ogon bakteriofaga jest proteina TssI, nazywana również VgrG (Valine-glycine repeat G). Posiada ona domeny podobne do domen białek gp27 i gp5 budujących centrum płytki podstawowej ogonka faga T4 [15]. Proteina VgrG stanowi zakończenie nanotuby Hcp i umożliwia bakterii atakującej przebicie ściany komórkowej [98]. Domena VgrG podobna do białka gp5 posiada sztywną i β-skręconą helikalną strukturę, formującą element przypominający igłę [41]. W wielu przypadkach zaobserwowano, że na „igle" VgrG zakotwiczona może być dodatkowa proteina posiadająca domenę PAAR, będąca toksycznym efektorem [99, 41, 22, 28]. W takim przypadku mowa jest o VgrG, które stanowią białka opiekuńcze właściwych efektorów SSTVI [80]. Dodatkowo, analogicznie jak w przypadku Hcp, wyodrębniono „evolved" VgrG z toksyczną domeną na końcu C [80]. Przykładem „evolved" VgrG są dwa białka syntetyzowane przez szczep *Agrobacterium tumefaciens* C58, które z dużą specyficznością kontrolują sekrecję dwóch toksycznych efektorów wykazujących aktywność DNazy (Type VI DNase Effectors, Tde): Tde1 oraz Tde2 [22].

Dodatkowymi elementami budującymi płytkę podstawową występującą w aparacie systemu sekrecji typu VI, są białka TssEFG. Białka te rekrutowane są przez białko TssK do kompleksu membranowego TssJLM [75]. Kompleks membranowy jest ewolucyjnie zbliżony do subkompleksu związanego z systemem sekrecji typu IVb i składa się z trzech konserwatywnych domen: błonowej lipoproteiny TssJ oraz białek TssL i TssM zakotwiczonych w ścianie komórkowej [76]. Biogeneza aparatury SSTVI rozpoczyna się formowaniem kompleksu membranowego TssJLM [75]. Białko TssM jest ATPazą należącą do rodziny IcmF (Intraellular Multiplication Protein F). Występujący w tym białku motyw Walkera A jest niezbędny w procesie hydrolizy ATP przez TssM, co zapewnia energię dla oddziaływań białka Hcp z TssL (białko to należy do rodziny ImcH/DotU) oraz jego sekrecji [67].

Podobnie jak w przypadku CDI, równie aktywność efektorów systemu sekrecji typu VI jest hamowana poprzez białka immunoprotekcyjne. Przykładem mogą być opisywany już powyżej efektor Tse2 wykorzystywany przez *P. aeruginosa*. Efektor ten działa jako



Ryc. 3. Schemat budowy aparatury systemu sekrecji typu VI

Białka Hcp oraz VgrG tworzą strukturę podobną do ogonka bakteriofaga, która poprzez skurcze struktury VipA/VipB może zostać translokowana do wnętrza innej komórki. Do białka VgrG przyłączone może być dodatkowe białko efektorowe.

inhibitor proliferacji komórek, a jego aktywność jest hamowana przez wysoce stabilne wiązanie się białka immunoprotekcyjnego Tsi2 (Type VI Secretion Immunity 2) [61]. Obecność pary toksyna/białko immunoprotekcyjne stwierdzono również dla takich gatunków jak *V. cholerae* [31, 51,], *P. mirabilis* [4] czy *Pseudomonas protegens* [115]. Schematyczne przedstawienie aparatury SSTVI zaprezentowano na rycinie 3.

3.2. Efektory systemu sekrecji typu VI

Różnorodność efektorów SSTVI jest znacznie większa niż w przypadku systemu CDI. Efektory można podzielić na takie, które stanowią mechanizm konkurencji bakteryjnej oraz na wywierające wpływ na organizmy eukariotyczne [2, 29]. Dodatkowo efektory transportowane przez ten system opisuje się jako efektory wyspecjalizowane (specialized effectors) – opisywane już „evolved" Hcp oraz VgrG, a także takie efektory, które oddziałują bezpośrednio z Hcp i/lub VgrG, często poprzez domenę PAAR (cargo effectors) [35]. Ze względu na mechanizm działania opisano cztery główne klasy efektorów oraz blokujących je białek immunoprotekcyjnych: 1) efektory o aktywności amidazy Tae (Type VI admidase effectors) oraz immunoproteiny Tai (Type VI amidase immunity), 2) efektory o aktywności hydrolazy glikozydowej Tge (Type VI glycoside hydrolase effectors) wraz z immunoproteinami Tgi (Type VI glikoside hydrolase immunity) – celem działania dla obu powyższych grup jest peptydoglikan, 3) efektory o aktywności lipazy Tle (Type VI lipase effectors), które hydrolizują fosfolipidy w błonie komórkowej, wraz z białkami protekcyjnymi Tli (Type VI lipase

immunit), 4) oraz efektory o aktywności DNazy Tde (Type VI DNase effectors) oraz ich immunoproteiny Tdi (Type VI DNase immunity) [35].

Jedną z toksyn należących do grupy Tae jest wspomniany powyżej efektor Tse1 kodowany w genomie *P. aeruginosa* w obrębie pierwszej wyspy kodującej białka Hcp ulegających sekrecji. Tse1 jest amidazą rozpoznającą specyficznie kwas γ-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelinowy (D-Glu-*m*DAP). Miejsce aktywne Tse1 jest łatwo dostępne i enzym wykazuje działanie *in vitro*. W badaniach *in vivo* wykazano, że enzym ten jest bardziej aktywny względem bakterii Gram-ujemnych niż bakterii Gram-dodatnich [91, 27]. Kolejne toksyny należące do grupy Tae, których aktywność enzymatyczne skierowana jest wobec peptydoglikanu – białka Ssp1 oraz Ssp2, produkowane są przez oportunistyczny patogen człowieka *Serratia marcescens*. Oba białka hamowane są przez proteiny immunoprotekcyjne kodowane przez geny *rap* znajdujące się w otoczeniu genów kodujących same toksyny [32].

Aktywność kolejnej z grup efektorów SSTVI, Tge, wykazano na przykładzie szczepu należącego do gatunku *P. protegens* [115]. Antybakteryjny efekt tego typu efektora skierowany może być w przypadku *P. protegens* m.in. wobec *Pseudomonas putida*. Dodatkowo struktura kompleksu efektora z właściwym dla niego białkiem immunoprotekcyjnym otrzymana z wykorzystaniem NMR pokazuje, że aktywność enzymatyczna hamowana jest poprzez wiązanie immunoproteiny do miejsca aktywnego [115]. Również wspominana wcześniej toksyna Tse3 należy do grupy toksyn Tge i wykazuje aktywność mureidazy [91].

Przykładami toksyn zaliczanych do Tle mogą być enzymy należące do grup PLA_1 oraz PLA_2, kolejno o aktywności fosfolipazy A_1 oraz A_2. Toksyny Tle są szeroko rozpowszechnione wśród bakterii patogennych. Kolejnym przykładem takiego efektora jest PldA syntetyzowana przez *P. aeruginosa*. Białko to jest efektorem systemu sekrecji typu VI, którego składowe kodowane są na drugiej wyspie białek Hcp ulegających sekrecji [92]. Enteroagregacyjne szczepy *E. coli* mogą syntetyzować toksynę Tle1 o aktywności fosfolipazy typu A_1 i A_2, która stanowi efektor wykorzystywany w konkurencji z innymi bakteriami. Aktywność efektora Tle1 hamowana jest przez immunoproteinę Tli1 poprzez tworzenie kompleksów w stosunku 1:1. Transport Tle1 możliwy jest poprzez interakcje białka z końcem C VgrG1, które posiada domenę podobną do transtyretyny [33].

Efektory należące go Tde zostały po raz pierwsze opisane przez Ma i wsp. (2014) na przykładzie szczepu *A. tumefaciens* C58 [66]. Efektor ten wykazuje aktywność DNazy i zapewnia szczepom *A. tumefaciens* przewagę zarówno w konkurencji wewnątrz-, jak i międzygatunkowej. Aktywność nukleolityczna wynika z obecności motywu HxxD i jest hamowana przez specyficzne białko immunoprotekcyjne, Tdi. Dodatkowo powyższą toksynę charakteryzuje brak istotnej homologii do innych bakteryjnych DNaz [66].

Toksyną wydzielaną przez SSTVI nie należącą do żadnej z wymienionych wyżej grup jest toksyna Tne2 o aktywności NADazy (Type VI NADase effector). Toksyna ta jest jedną z dwóch syntetyzowanych przez szczep *P. protegens* – pierwszą jest RhsA wykazująca aktywność nukleolityczną. Toksynie Tne2 odpowiada specyficzne białko immunoprotekcyjne. Co znamienne, geny kodujące toksyny o aktywności NADazy są szeroko rozpowszechnione zarówno wśród bakterii Gram-ujemnych, jak i wśród bakterii Gram-dodatnich. W drugim przypadku sekrecja toksyn odbywa się z udziałem systemu sekrecji typu VII, który jest charakterystyczna dla bakterii Gram-dodatnich [104].

Kolejnym przykładem efektorów SSTVI są toksyny RHS (Rearrangement hotspot). Toksyny te są szeroko rozpowszechnione wśród bakterii Gram-ujemnych. Geny je kodujące odnaleźć można w genomach takich gatunków jak *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* i in. [56, 54, 65]. Podobnie jak białko CdiA, również toksyny RHS składają się z konserwatywnego końca N, w skład którego wchodzą powtórzenia YD definiujące przedstawioną grupę efektorów oraz końca C stanowiącego domenę toksyczną. Pomiędzy tymi regionami występuje konserwatywny motyw PxxxxDPxGL. Aktywność toksycznej domeny końca C hamowana jest przez swoiste białko immunoprotekcyjny [54]. Badania przeprowadzone przez Alcoforado Diniza i wsp. na przykładzie *S. marcescens* wskazują, że toksyny RHS stanowią główny efektor systemu sekrecji warunkujący wewnątrzgatunkową konkurencję bakteryjną. *Serratia marcescens* Db10 syntetyzować może co najmniej dwie toksyny należące do grupy RHS (Rhs1 oraz Rhs2). Białko Rhs2 jest DNazą, natomiast w przypadku Rhs1 wykazano obecność toksycznej domeny o nieznanym mechanizmie działania [1]. Białka RHS bardzo często posiadają również domenę PAAR, która umożliwia rozpoznanie toksyny przez system sekrecji typu VI, jej związania do VgrG oraz translokację do wnętrza komórki atakowanej [65].

Jednym z czynników regulujących działanie SSTVI jest Quorum Sensing [101]. Na przykładzie *B. thailandensis* wykazano, że szczepy posiadające mutację w receptorach autoinduktorów QS wykazują zmniejszoną ekspresję efektorów SSTVI oraz białek immunoprotekcyjnych, czego rezultatem jest zatrzymanie ich proliferacji w trakcie hodowli w obecności szczepów rodzicielskich posiadających w pełni funkcjonalny system QS [68]. W przypadku *V. cholerae* C6706 SSTVI pozostaje pod kontrolą QS oraz globalnego regulatora TsrA – mutacje w genach *tsrA* oraz *luxO* wywołują zwiększoną ekspresję genów kodujących elementy strukturalne aparatury SSTVI. Efekt ten jest zależny

od regulatora HapR, który wiąże się do regionu promotorowego genów kodujących składowe SSTVI [122].

Co ciekawe QS może regulować ekspresję różnych kopii klastrów kodujących SSTVI w różnym stopniu, co ma miejsce m.in. w przypadku szczepu *P. aeruginosa* PAO1. Szczep ten posiada trzy klastry genów SSTVI (H1-3). Klaster H1 koduje opisane wcześniej toksyny Tse1-3 [48]. Jak wykazano, geny klastera H2 ulegają zwiększonej ekspresji (regulowanej systemami QS typu Las i Rhl) w trakcie przechodzenia z fazy logarytmicznego wzrostu w fazę stacjonarną. Dodatkowo inhibicja ekspresji klastra H2 wywoływana jest w obecności jonów żelaza [96]. Wyniki wcześniejszych badań z zastosowaniem szczepu *P. aeruginosa* PA14 pokazują, że występujące w nim trzy klastry H1-3 kodujące SSTVI również są regulowane przez QS, jednak w odmienny sposób. W przypadku PA14, ekspresja H1 ulega supresji, natomiast ekspresja H2 oraz H3 jest zwiększona w wyniku działania regulatorów LasR oraz regulatora transkrypcyjnego MvfR [60]. Szczepy PAO1 oraz PA14 różnią się liczbą kopii genów kodujących elementy SSTVI [60], a specyficzna organizacja klastra H2 jest cechą charakterystyczną dla szczepu PA14 [48]. Warto nadmienić, że poszczególne kopie SSTVI u *P. aeruginosa* pozostają również pod kontrolą globalnych regulatorów RsmA oraz AmrZ [3].

Odmienna regulacja poprzez QS dwóch różnych klastrów genów SSTVI jest również obserwowana w przypadku *Vibrio parahaemolyticus*. Gatunek ten posiada klastry nazwane SSTVI1 (VP1386-1414) oraz SSTVI2 (VPA1024-1046). Ekspresja SSTVI1 jest zahamowana a SSTVI2 indukowana przez OpaR – regulator zależny od gęstości populacji [110]. Wyniki badań Zhang i wsp. (2011) pokazują, że SSTVI może być regulowany również przez warunki środowiskowe. Na przykładzie *Yersinia pseudotuberculosis*, która posiada w swoim genomie 4 klastry genów SSTVI, wykazano ich różną termoregulację, przy czym jedynie ekspresja klastera SSTVI4 była pozytywnie regulowana w temperaturze 26°C. Dodatkowo dochodziło do podwyższonej ekspresji tego klastra w odpowiedzi na działanie syntetaz laktonów homoseryny YpsI oraz YtbI. Wnioski takie wysnuto na podstawie wykorzystania szczepów noszących delecję genów kodujących powyższe syntetazy, przy czym wpływ delecji genu *ypsI* był silniejszy w porównaniu do delecji genu *ytbI* [121]. System sekrecji typu VI kontrolowany przez laktony homoseryny opisano także w przypadku szczepu *Aeromonas hydrophila* SSU [50].

Czynnikiem warunkującym konkurencję międzygatunkową opartą na SSTVI może być środowisko wzrostu, co zaprezentowano na przykładzie eksperymentów ze szczepem *P. aeruginosa* w konkurencji ze szczepem *A. tumefaciens*. W warunkach laboratoryjnych szczepem dominującym był *P. aeruginosa*, zaś w warunkach imitujących środowisko naturalne dominował *A. tumefaciens* [49]. System sekrecji typu VI regulowany jest również poprzez samą obecność konkurentów. Badania Lazzaro i wsp. pokazują, że szczep *S. marcescens* Db10 dostosowuje poziom ekspresji genów SSTVI do potencjału konkurentów. Ekspresja jest nasilona w obecności silnych konkurentów i wyciszana w sytuacji względnej równowagi pomiędzy konkurentami [57].

Ciekawe wyniki badań przedstawił również Weber wraz z wsp. (2009). Na przykładzie szczepu *Vibrio anguillarum* NB10 wykazali, że białka SSTVI mogą pośrednio regulować ekspresję proteaz EmpA oraz PrtV co wynikało z bezpośredniego, pozytywnego wpływu na ekspresję regulatora odpowiedzi na stres – RpoS – oraz regulatora systemu QS – VanT [112].

4. Przynależność do systemu polimorficznych toksyn

Systemy sekrecji typu Vb i typu VI, warunkujące konkurencję wymagającą kontaktu można przypisać do tzw. systemów polimorficznych toksyn (Polymophic Toxin Systems, PTS) – stosunkowo niedawno wyodrębnionej grupy białkowych toksyn antybakteryjnych. O przynależności danej toksyny do PTS decydują następujące czynniki:

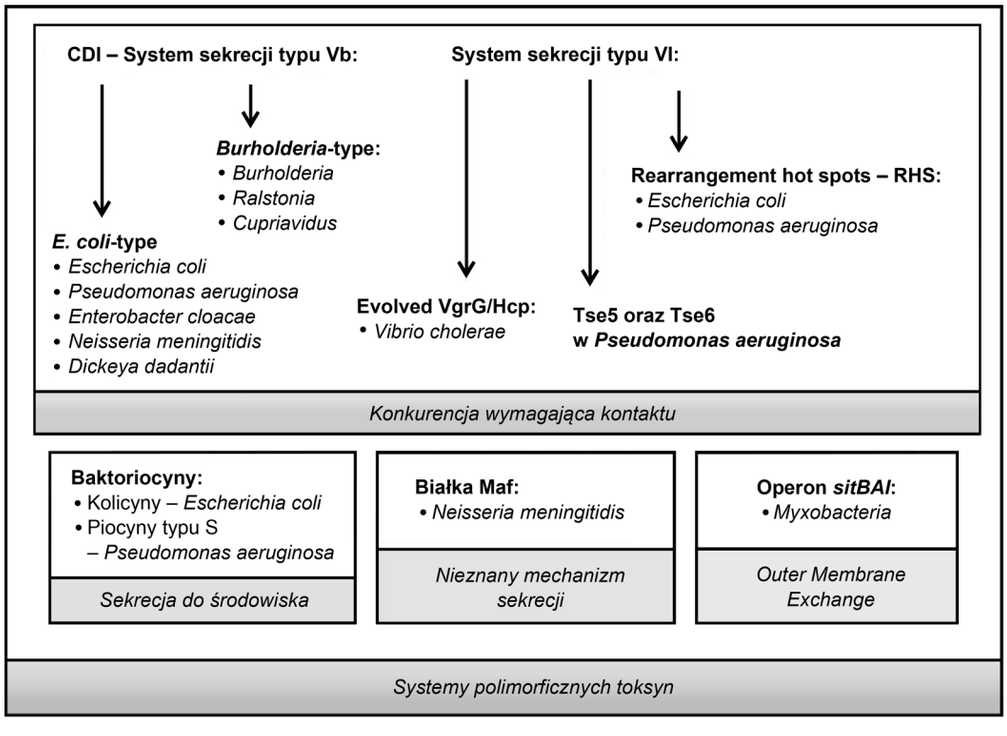
1) Homologiczna budowa: toksyny należące do PTS składają się z dwóch części: końca aminowego oraz końca karboksylowego, który stanowi właściwą toksynę. Oba fragmenty są oddzielone od siebie konserwatywnym motywem aminokwasowym. Koniec aminowy jest fragmentem o wysokim stopniu podobieństwa filogenetycznego i często odgrywa on rolę w transporcie regionu toksycznego, który jest silnie zróżnicowany pomiędzy poszczególnymi gatunkami, ale również pomiędzy szczapami.
2) Obecność białka stanowiącego immunoproteinę: białko takie powoduje inhibicję toksyny, chroni w ten sposób komórkę przed autoinhibicją, ale również przed działaniem toksyny wprowadzonej przez druga komórkę należącą do tego samego gatunku/szczepu. Immunoproteina stanowi inhibitor jedynie dla specyficznej dla siebie toksyny. Zróżnicowanie międzygatunkowe białek protekcyjnych odpowiada zróżnicowaniu toksyn [120, 46].

Do grupy polimorficznych toksyn zalicza się toksyny CdiA, a także niektóre efektory wydzielane przez system sekrecji typu VI – RHS oraz „evolved" Hcp/VgrG. Innym przykładem PTS są produkty obecnych w genomie rodzaju *Neisseria* genów *maf* (multiple adhesin family) [46]. Geny *maf* znajdują się w obrębie wyspy patogeniczności IHT-G (Island of Horizontally Transferred DNA-G). Wykazano, że gen *mafB* koduje funkcjonalnie aktywną toksynę. Toksyna ta posiada

aktywność rybonukleazy EndoU. Gen znajdujący się bezpośrednio za *mafB* – *mafI* – koduje białko immunoprotekcyjne. Toksyna MafB jest specyficzna dla rodzaju *Neisseria*. Cechą charakterystyczną tego systemu, jest to, że białko MafB ma strukturę globularną. Dodatkowy gen, *mafA,* kodujący wbudowaną w błonę zewnętrzną lipoproteinę, jest często odnajdywany przed genem kodującym toksynę MafB. Jego funkcja nie została dotychczas określona. Sekwencja nukleotydowa tego genu nie posiada podobieństwa do sekwencji nukleotydowych genów innych systemów sekrecji [44, 45]. Podobnie dla rodzaju *Myxobacteria* opisano klaster genów kodujących toksyny z grupy PTS. Są to toksyny transportowane pomiędzy komórkami poprzez wymianę poprzez błonę zewnętrzną (Outer Membrane Exchange, OME). Klaster ten nazwano *sitBAI*. Białko SitA jest polimorficzną toksyną, której aktywność hamuje SitI. SitB pełni funkcję białka pomocniczego, odgrywa znacząca role w funkcjonowaniu SitA. Toksyczna domena białka SitA zlokalizowana jest na C końcu proteiny [108]. Polimorficzne toksyny mogą również wykazywać działanie „na odległość", tzn. zostają one wydzielone do środowiska bytowania bakterii i dyfundują w nim. Wymienić tu można bakteriocyny: kolicyny (colicins) oraz rozpuszczalne piocyny (Soluble pyocins, S-pyocins) [120, 46] (Ryc. 4).

5. Znaczenie systemów konkurencji w biologii bakterii

Szczep *E. coli* EC93 efektywnie wykorzystuje system CDI jako mechanizm zapewniający mu przewagę w konkurencji wewnątrzgatunkowej. Szczep ten jest głównym izolatem z kału szczurów [10]. Sugeruje się, że system CDI służy do eliminacji konkurujących komórek. Jednak dotyczy to jedynie pokrewnych szczepów [89] i jak dotąd nie wykazano by CDI miało znaczenie w konkurencji międzygatunkowej. Na przykładzie *B. thailandensis* zaobserwowano że, warunkowana przez system CDI konkurencja oraz dyskryminacja krewniacza reguluje strukturę biofilmu [7]. Badania pokazują również, że CDI może kształtować strukturę biofilmu w sposób niezależny od procesów hamowania wzrostu [37, 88], poprzez wywoływanie agregacji komórek wykazujących ekspresję genów kodujących identyczne białka CdiA [88]. Wykazano, że także białko BcpA warunkuje współdziałanie komórek [37], a klaster genów *bcpAIOB* jest mediatorem komunikacji komórkowej [38]. Podobne obserwacje poczyniono na przykładzie *P. aeruginosa*, bakterii posiadającej dwie kopie genów kodujących białka systemu CDI. Wprawdzie badania wykazały, że ekspresja żadnej z nich nie jest powiązana z pierwszymi etapami biogenezy bio-



Ryc. 4. Systemy polimorficznych toksyn

Efektory systemu CDI oraz SSTVI należą do grupy polimorficznych toksyn, które charakteryzują się homologiczną budową oraz występowaniem w komórkach białka immunoprotekcyjnego. Do działania efektorów CDI oraz SSTVI wymagany jest bezpośredni kontakt komórek, a wymiana następuje z zastosowaniem aparatu sekrecji tych systemów. Choć toksyny kodowane przez operon *sitBAI* również wymieniane są w wyniku kontaktu komórek, sekrecja zachodzi według mechanizmu Outer Membrane Exchange. Bakteriocyny wydzielane są do środowiska. Mechanizm sekrecji toksyn z rodziny Maf jest nieznany.

filmu, jak to ma miejsce w przypadku rodzaju *Escherichia* oraz *Burkholderia*, jednak odgrywają one rolę w konkurencji bakteryjnej – umożliwiają wykluczenie szczepów niespokrewnionych, co wykazano na modelu konkurencji szczepów delecyjnych ze szczepem dzikim. Co istotne, badania nad CDI w przypadku *P. aeruginosa* po raz pierwszy pokazały, że system ten stanowi czynnik wirulencji istotny w procesach infekcji dróg oddechowych [70]. Pytanie o rolę CDI w biologii bakterii nadal pozostaje bez jednoznacznej odpowiedzi. Najnowsze badania z wykorzystaniem szczepu *E. coli* EC93 wskazują na istotne znaczenie klastra *cdiBAI* w stabilizacji elementu genetycznego – plazmidu koniugacyjnego. Plazmid, który w warunkach naturalnych zanikał po zajściu ok. 50 podziałów komórkowych, utrzymywał się w 60% komórek z populacji szczepu EC93 przez dwukrotnie dłuższy okres po wbudowaniu do niego genów *cdiBAI* [86].

Liczne doniesienia wskazują, że SSTVI jest elementem bakteryjnej konkurencji, zarówno wewnątrz-, jak i międzygatunkowej [2, 26, 62, 81, 92]. Fakt, że SSTVI efektywnie dostarcza toksyczne efektory pomiędzy komórkami różnych szczepów wynikać może z tego, że w przeciwieństwie do CDI, system ten nie wymaga powierzchniowego receptora do translokacji toksyn. Z zastosowaniem mikroskopii fluoroscencyjnej Gerc i wsp. badali dynamikę biosyntezy aparatury SSTVI na przykładzie *S. marcescens* Db10. Wyniki tych eksperymentów wykazały, że atak z zastosowaniem SSTVI nie wymaga wcześniejszej indukcji kontaktem komórek [39]. Takie obserwacje wskazują na istotę SSTVI w konkurencji o kolonizację niszy ekologicznej. Należy jednak mieć na względzie, że wykorzystanie SSTVI stanowi dla komórki wysoki koszt, przez co m.in. staje się ona bardziej wrażliwa na atak ze strony konkurujących komórek [59].

Podobnie jak CDI, także SSTVI nie jest jedynie prostym systemem konkurencji ale dodatkowo odgrywa ważną rolę w socjobiologii bakterii oraz w zjawisku dyskryminacji krewniaczej. Badania z zastosowaniem modeli matematycznych w połączeniu z eksperymentami *in vitro* wskazują, że konkurencja bakteryjna oparta na SSTVI w znacznym stopniu modeluje wzajemne oddziaływania komórek i stanowić może ważny mechanizm, który w sposób pośredni – poprzez eliminację niespokrewnionych szczepów – prowadzi do rozwoju współdziałania komórek krewniaczych [69]. System sekrecji typu VI zaangażowany jest także w powstawanie i dojrzewanie biofilmu bakteryjnego oraz w komunikację pomiędzy komórkami w biofilmie, co zaprezentowana na przykładzie szczepu *P. fluorescens* MFE01 [36] oraz w przypadku szczepu *Acidovorax citrulli* xjl12, gdy zaobserwowano, że obecność i funkcje genów kodujących rdzeń SSTVI wpływają na tworzenie biofilmu [105].

Ciekawym przykładem dyskryminacji krewniaczej warunkowanej przez SSTVI jest fenomen Dienesa szczepów *P. mirabilis* [113]. Zjawisko to polega na tworzeniu w trakcie ruchu rozpełzłego makroskopowej linii granicznej, nazywanej linią demarkacyjną, pomiędzy niespokrewnionymi szczepami *P. mirabilis*. Rozpoznanie pokrewieństwa między szczepami wynika z zależnej od SSTVI wymiany białka IdsD, kodowanego przez operon *idsABCDEF*. Białko to po wniknięciu do cytoplazmy może tworzyć kompleksy z IdsE, co stanowi informacje o pokrewieństwie szczepów. Szczepy niespokrewnione – takie, dla których nie dochodzi do powstania kompleksu IdsDE, konkurują ze sobą [25, 93]. Możliwym efektorem konkurencji są białka kodowane przez operon *idrABCDE*, które również są transportowane przez aparaturę SSTVI [94, 113]. Białka Ids oraz Idr stanowią przykład niekanonicznych efektorów SSTVI, co sugeruje szeroki zakres możliwości działania SSTVI. Jak wykazano, w konkurencję pomiędzy szczepami *P. mirabilis* tworzącymi linie demarkacyjna zaangażowany jest także tzw. pierwotny operon efektora hcp-vgrG (Primary hcp-vgrG EFfector operon, PEF), którego aktywność hamowana jest przez specyficzne białko immunoprotekcyjne [4, 5]. Sugeruje to, że zjawisko Dienesa najprawdopodobniej warunkowane jest wieloma niezależnymi mechanizmami.

6. Podsumowanie

System inhibicji wzrostu zależnej od kontaktu (CDI) oraz system sekrecji typu VI (SSTVI) warunkują konkurencję bakteryjną i zjawisko dyskryminacji krewniaczej wśród bakterii Gram-ujemnych. Co istotne, pomimo licznych podobieństw strukturalnych i homologicznej funkcji biologicznej, molekularne podstawy działania obu systemów są wyraźnie różne. Zastanawiająca jest również przynależność obu tych systemów do grupy polimorficznych toksyn, które wydają się być ewolucyjnie pokrewne. Szerokie występowanie obu systemów, obecność wielu typów toksycznych efektorów oraz specyficznych względem nich immunoprotein, ale także fakt, że poszczególne gatunki, a nawet szczepy, wykazują ekspresję (będącą pod ścisłą kontrolą licznych czynników) obu systemów sugeruje, że powyższe mechanizmy odgrywają ogromną rolę w socjobiologii bakterii. Dotychczas prowadzone badania skupiały się w głównej mierze na wyjaśnieniu mechanizmów działania CDI oraz SSTVI, a pytanie o ich populacyjne znaczenie nadal pozostaje bez odpowiedzi Ciekawym kierunkiem wydają się być badania zmierzające do wyjaśnienia hierarchii działania i potencjału obu systemów w układach z zastosowaniem dużych populacji, wykraczających poza dotychczas badane układy mutant-szczep rodzicielski lub dwa konkurujące

szczepy/gatunki. Taki kierunek wpisuje się w rosnące w ostatnim czasie zainteresowanie populacją bakteryjną rozumianą jako ściśle zależną od siebie „społeczność komórek". Niewykluczona jest również możliwość praktycznego zastosowania wiedzy zdobytej z badania powyższych zależności, m.in. przy projektowaniu nowych metod detekcji i różnicowania drobnoustrojów oraz metod ich eradykacji, które mogłyby zastąpić coraz mniej skuteczne antybiotyki.

Podziękowania

Artykuł finansowany ze środków BS UJK nr 612 529.

Piśmienictwo

1. Alcoforado Diniz J., Coulthurst S.J.: Intraspecies competition in *Serratia marcescens* is mediated by type VI-secreted Rhs effectors and a conserved effector-associated accessory protein. *J. Bacteriol.* **197**, 2350–2360 (2015)
2. Alcoforado Diniz J., Liu Y.C., Coulthurst S.J.: Molecular weaponry: Diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. *Cell. Microbiol,* **17**, 1742–1751 (2015)
3. Allsopp L.P., Wood T.E., Howard S.A., Maggiorelli F., Nolan L.M., Wettstadt S., Filloux A.: RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 7707–7712 (2017)
4. Alteri C.J., Mobley H.L.T. i wsp.: Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003608 (2013)
5. Alteri C.J., Himpsl S.D., Zhu K., Hershey H.L., Musili N., Miller J.E., Mobley H.L.T.: Subtle variation within conserved effector operon gene products contributes to T6SS-mediated killing and immunity. *PLoS Pathogens*, **13**, e1006729 (2017)
6. Anderson M.S., Garcia E.C., Cotter P.A.: The *Burkholderia bcpA-IOB* genes define unique classes of two-partner secretion and contact dependent growth inhibition systems. *PLoS Genetics*, **8**, e1002877 (2012)
7. Anderson M.S., Garcia E.C., Cotter P.A.: Kind discrimination and competitive exclusion mediated by contact-dependent growth inhibition systems shape biofilm community structure. *PLoS Pathogens*, **10**, e1004076 (2014)
8. Aoki S.K., Diner E.J., de Roodenbeke C.T., Burgess B.R., Poole S.J., Braaten B.A., Low D.A.: A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature*, **468**, 439–442 (2010)
9. Aoki S.K., Low D.A. i wsp.: Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Mol. Microbiol.* **70**, 323–340 (2008)
10. Aoki S.K., Pamma R., Hernday A.D., Bickham J.E., Braaten B.A., Low D.A.: Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*, **309**, 1245–1248 (2005)
11. Aoki S.K., Poole S.J., Hayes C.S., Low D.A.: Toxin on a stick: modular CDI toxin delivery systems play roles in bacterial competition. *Virulence*, **2**, 356–359 (2011)
12. Aoki S.K., Webb J.S., Braaten B.A., Low D.A.: Contact-dependent growth inhibition causes reversible metabolic downregulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191,** 1777–1786 (2009)
13. Bandara H.M., Yau J.Y., Watt R.M., Jin L.J., Samaranayake L.P.: *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol.* **10**, DOI:10.1186/1471-2180-10-125 (2010)
14. Bandara H.M.H.N., Yau J.Y.Y., Watt R.M., Jin L.J., Samaranayake L.P.: *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate in vitro *Candida* biofilm formation. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1623–1631 (2009)
15. Basler M.: Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **370**, DOI:10.1098/rstb.2015.0021 (2005)
16. Batot G., Goulding C.W.: i wsp.: The CDI toxin of *Yersinia kristensenii* is a novel bacterial member of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res.* **45,** 5013–5025 (2017)
17. Beck C.M., Diner E.J., Kim J.J., Low D.A., Hayes C.S.: The F pilus mediates a novel pathway of CDI toxin import. *Mol. Microbiol.* **93**, 276–290 (2014)
18. Beck C.M., Morse R.P., Cunningham D.A., Iniguez A., Low D.A., Goulding C.W., Hayes C.S.: CdiA from *Enterobacter cloacae* delivers a toxic ribosomal RNase into target bacteria. *Structure,* **22**, 707–718 (2015)
19. Beck C.M., Willett J.L.E., Cunningham D.A., Kim J.J., Low D.A., Hayes C.S.: CdiA effectors from uropathogenic *Escherichia coli* use heterotrimeric osmoporins as receptors to recognize target bacteria. *PLoS Pathogens,* **12**, e1005925 (2016)
20. Bingle L.E., Bailey C.M., Pallen M.J.: Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 3–8 (2008)
21. Blango M.G., Mulvey M.A.: Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 177–181 (2009)
22. Bondage D.D., Lin J.-S., Ma L.-S., Kuo C.-H., Lai E.-M.: VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor-effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E3931-40 (2016)
23. Bröms J.E., Ishikawa T., Wai S.N., Sjöstedt A.: A functional VipA-VipB interaction is required for the type VI secretion system activity of *Vibrio cholerae* O1 strain A1552. *BMC Microbiol.* **13**:96, DOI:10.1186/1471-2180-13-96 (2013)
24. Brzozowska E., Bazan J., Gamian A.: Funkcje białek bakteriofagowych. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **65**, 167–176 (2011)
25. Cardarelli L., Saak C., Gibbs K.A.: Two proteins form a heteromeric bacterial self-recognition complex in which variable subdomains determine allele-restricted binding. *mBio*, **6**, DOI:10.1128/mBio.00251-15 (2015)
26. Carruthers M.D., Nicholson P.A., Tracy E.N., Munson R.S.: *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *PLoS ONE,* **8**, e59388 (2013)
27. Chou S., Bui N.K., Russell A.B., Lexa K.W., Gardiner T.E., LeRoux M., Vollmer W., Mougous J.D.: Structure of a peptidoglycan amidase effector targeted to Gram-negative bacteria by the type VI secretion system. *Cell Rep.* **1**, 656–664 (2012)
28. Cianfanelli F.R., Alcoforado Diniz J., Guo M., De Cesare V., Trost M., Coulthurst S.J.: VgrG and PAAR proteins define distinct versions of a functional type VI secretion system. *PLoS Pathogens*, **12**, e1005735 (2016)
29. Coulthurst S.J.: The type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. *Res. Microbiol.* **164**, 640–654 (2013)
30. Diner E.J., Beck C.M., Webb J.S., Low D.A., Hayes C.S.: Identification of a target cell permissive factor required for contact-dependent growth inhibition (CDI). *Genes Dev.* **26**, 515–525 (2012)
31. Dong T.G., Ho B.T., Yoder-Himes D.R., Mekalanos J.J.: Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2623–2628 (2013)
32. English G., Trunk K., Rao V.A., Srikannathasan V., Hunter W.N., Coulthurst S.J.: New secreted toxins and immunity proteins encoded within the type VI secretion system gene cluster of *Serratia marcescens*. *Mol. Microbiol.* **86**, 921–936 (2012)

33. Flaugnatti N., Journet L. i wsp.: A phospholipase A1 antibacterial type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Mol. Microbiol.* **99**, 1099–1118 (2016)
34. Foster K.R., Bell T.: Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Curr. Biol.* **22**, 1845–1850 (2012)
35. Gallique M., Bouteiller M., Merieau A.: The type VI secretion system: A dynamic system for bacterial communication? *Front. Microbiol.* **8**, DOI:10.3389/fmicb.2017.01454 (2017)
36. Gallique M., Decoin V., Barbey C., Rosay T., Feuilloley M.G.J., Orange N., Merieau A.: Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation. *PLoS ONE,* **12**, e0170770 (2017)
37. Garcia E.C., Anderson M.S., Hagar J.A., Cotter P.A.: *Burkholderia* BcpA mediates biofilm formation independently of interbacterial contact-dependent growth inhibition. *Mol. Microbiol.* **89**, 1213–1225 (2013)
38. Garcia E.C., Perault A.I., Marlatt S.A., Cotter P.A.: Interbacterial signaling via *Burkholderia* contact-dependent growth inhibition system proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 8296–8301 (2016)
39. Gerc A.J., Diepold A., Trunk K., Porter M., Rickman C., Armitage J.P., Stanley-Wall N.R., Coulthurst S.J.: Visualization of the *Serratia* type VI secretion system reveals unprovoked attacks and dynamic assembly. *Cell Rep.* **12**, 2131–2142 (2015)
40. Green E.R., Mecsas J.: Bacterial secretion systems – an overview. *Microbiol. Spectr.* **4**, DOI:10.1128/microbiolspec (2016)
41. Hachani A., Allsopp L.P., Oduko Y., Filloux A.: The VgrG proteins are "la carte" delivery systems for bacterial type VI effectors. *J. Biol. Chem.* **289**, 17872–17884 (2014)
42. Hayes C.S., Koskiniemi S., Ruhe Z.C., Poole S.J., Low D.A.: Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, DOI: 10.1101/cshperspect.a010025 (2014)
43. Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S.B.: Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 15–25 (2010)
44. Jamet A., Jousset A.B., Euphrasie D., Mukorako P., Boucharlat A., Ducousso A., Charbit A., Nassif X.: A new family of secreted toxins in pathogenic *Neisseria* species. *PLoS Pathogens*, **11**, e1004592 (2015)
45. Jamet A., Nassif X.: Characterization of the Maf family of polymorphic toxins in pathogenic *Neisseria* species. *Microb. Cell*, **2**, 88–90 (2015)
46. Jamet A., Nassif X.: New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria. *mBio*, **6**, DOI:10.1128/mBio.00285-15 (2015)
47. Jones A.M., Garza-Sánchez F., So J., Hayes C.S., Low D.A.: Activation of contact-dependent antibacterial tRNase toxins by translation elongation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, DOI:10.1073/pnas.1619273114 (2017)
48. Jones C., Hachani A., Manoli E., Filloux A.: An *rhs* gene linked to the second type VI secretion cluster is a feature of the *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *J. Bacteriol.* **196**, 800–810 (2014)
49. Kapitein N., Mogk A.: Type VI secretion system helps find a niche. *Cell Host Microbe*, **16**, DOI:10.1016/j.chom.2014.06.012 (2014)
50. Khajanchi B.K., Sha J., Kozlova E.V., Erova T.E., Suarez G., Sierra J.C., Popov V.L., Horneman A. J., Chopra A.K.: N-acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*, **155**, 3518–3531 (2009)
51. Kirchberger P.C., Unterweger D., Provenzano D., Pukatzki S., Boucher Y.: Sequential displacement of type VI secretion system effector genes leads to evolution of diverse immunity gene arrays in *Vibrio cholerae*. *Sci. Rep.* **7**, DOI:10.1038/srep45133 (2017)
52. Konovalova A., Søgaard-Andersen L.: Close encounters: Contact-dependent interactions in bacteria. *Mol. Microbiol.* **81**, 297–301 (2011)
53. Koskiniemi S., Garza-Sánchez F., Edman N., Chaudhuri S., Poole S.J., Manoil C., Hayes C.S., Low D.A.: Genetic analysis of the CDI pathway from *Burkholderia pseudomallei* 1026b. *PLoS ONE,* **10**, e0120265 (2015)
54. Koskiniemi S., Lamoureux J.G., Nikolakakis K.C., t'Kint de Roodenbeke C., Kaplan M.D., Low D.A, Hayes C.S.: Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7032–7037 (2013)
55. Kube S., Wendler P.: Structural comparison of contractile nanomachines. *AIMS Biophysics*, **2**, 88–115 (2015)
56. Kung V.L., Khare S., Stehlik C., Bacon E.M., Hughes A.J., Hauser A.R.: An *rhs* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1275–1280 (2012)
57. Lazzaro M., Feldman M.F., Vescovi E.G.: A transcriptional regulatory mechanism finely tunes the firing of Type VI Secretion System in response to bacterial enemies. *mBio*, **8**, DOI:10.1128/mBio.00559-17 (2017)
58. Leiman P.G., Basler M., Ramagopal U.A., Bonanno J.B., Sauder J.M., Pukatzki S., Burley S.K, Almo S.C., Mekalanos J.J.: Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4154–4159 (2009)
59. LeRoux M., Mougous J.D. i wsp.: Quantitative single-cell characterization of bacterial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**: 19804–19809 (2012)
60. Lesic B., Starkey M., He J., Hazan R., Rahme L.G.: Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology*, **155**, 2845–2855 (2009)
61. Li M., Le Trong I., Carl M.A., Larson E.T., Chou S., de Leon J.A., Dove S.L., Stenkamp R.E., Mougous J.D.: Structural basis for type VI secretion effector recognition by a cognate immunity protein. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002613 (2012)
62. Liu L., Ye M., Li X., Li J., Deng Z., Yao Y.-F., Ou H.-Y.: Identification and characterization of an antibacterial Type VI Secretion System in the carbapenem-resistant strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. *Front. Cellular Infect. Microbiol.* **7**, DOI:10.3389/fcimb.2017.00442 (2017)
63. Lyons N.A., Kraigher B., Stefanic P., Mandic-Mulec I., Kolter R.: A combinatorial kin discrimination system in *Bacillus subtilis*. *Curr. Biol.* **26**, 733–742 (2016)
64. Ma J., Pan Z., Huang J., Sun M., Lu C., Yao H.: The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence*, **8**, DOI:10.1080/21505594.2017.1279374 (2017)
65. Ma J., Sun M., Dong W., Pan Z., Lu C., Yao H.: PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. *Environment. Microbiol.* **19**, 345–360 (2017)
66. Ma L.S., Hachani A., Lin J.S., Filloux A., Lai E.M.: *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell Host Microbe*, **16**, 94–104 (2014)
67. Ma L.S., Narberhaus F., Lai E.M.: IcmF family protein TssM exhibits ATPase activity and energizes type VI secretion. *J. Biol. Chem.* **287**, 15610–15621 (2012)
68. Majerczyk C., Schneider E., Greenberg E.P.: Quorum sensing control of type VI secretion factors restricts the proliferation of quorum-sensing mutants. *eLife*, **5**, DOI:10.7554/eLife.14712 (2016)

69. McNally L., Bernardy E., Thomas J., Kalziqi A., Pentz J.T., Brown S., Hammer B., Yunker P.Y., Ratcliff W.: Killing by Type VI secretion drives clonal phase separation and the evolution of cooperation. *Nat. Commun.* **8**, DOI:10.1101/063487 (2017)
70. Melvin J.A., Gaston J.R., Phillips S.N., Springer M.J., Marshall C.W., Shanks R.M.Q., Bomberger M.: *Pseudomonas aeruginosa* contact-dependent growth inhibition plays dual role in host-pathogen interactions. *mSphere*, **2**, e00336-17 (2017)
71. Mercy C., Ize B., Salcedo S.P., de Bentzmann S., Bigot S.: Functional characterization of *Pseudomonas* contact dependent growth inhibition (CDI) systems. *PloS One*, **11**, e0147435 (2016)
72. Morse R.P., Nikolakakis K.C., Willett J.L.E., Gerrick E., Low D.A., Hayes C.S., Goulding C.W.: Structural basis of toxicity and immunity in contact-dependent growth inhibition (CDI) systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 21480–21485 (2012)
73. Morse R.P., Willett J.L.E., Johnson P.M., Zheng M., Credali A., Iniguez A., Nowick J.S., Hayes C.S., Goulding C.W.: Diversification of β-augmentation interactions between CDI toxin/immunity proteins. *J. Mol. Biol.* **427**, 3766–3784 (2016)
74. Myszka K., Czaczyk K.: Mechanizm *quorum sensing* jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **64**, 582–589 (2010)
75. Nazarov S., Schneider J.P., Brackmann M., Goldie K.N., Stahlberg H., Basler M.: Cryo-EM reconstruction of Type VI secretion system baseplate and sheath distal end. *The EMBO Journal,* e201797103 (2017)
76. Nguyen V.S., Cambillau C. i wsp.: Type VI secretion TssK baseplate protein exhibits structural similarity with phage receptor-binding proteins and evolved to bind the membrane complex. *Nat. Microbiol.* **2**, DOI:10.1038/nmicrobiol.2017.103 (2017)
77. Nikolakakis K.C., Low D.A. i wsp.: The toxin/immunity network of *Burkholderia pseudomallei* contact-dependent growth inhibition (CDI) systems. *Mol. Microbiol.* **84**, 516–529 (2012)
78. Ogier J.C., Duvic B., Lanois A., Givaudan A., Gaudriault S.: A new member of the growing family of contact-dependent growth inhibition systems in *Xenorhabdus doucetiae*. *PLoS ONE*, **11**, e0167443 (2016)
79. Peng Y., Tan C. i wsp.: Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system. *Sci. Rep.* **6**, DOI: 10.1038/srep26816 (2016)
80. Pukatzki S., McAuley S.B., Miyata S.T.: The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 11–17 (2009)
81. Ray A., Schwartz N., de Souza Santos M., Zhang J., Orth K., Salomon D.: Type VI secretion system MIX-effectors carry both antibacterial and anti-eukaryotic activities. *EMBO Reports*, e201744226 (2017)
82. Records A.R.: The Type VI Secretion System: A multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**, 751–757 (2011)
83. Rendueles O., Ghigo J.: Mechanisms of competition in biofilm bommunities. *Microbiol. Spect.* **3**, DOI:10.1128/microbiolspec.MB-0009-2014.f1 (2015)
84. Røder H.L., Sørensen S.J., Burmølle M.: Studying bacterial multispecies biofilms: Where to start? *Trends Microbiol.* **24**, 503–513 (2016)
85. Ruhe Z.C., Nguyen J.Y., Beck C.M., Low D.A., Hayes C.S.: The proton-motive force is required for translocation of CDI toxins across the inner membrane of target bacteria. *Mol. Microbiol.* **94** 466–481 (2014)
86. Ruhe Z.C., Nguyen J.Y., Chen A.J., Leung N.Y., Hayes C.S., Low D.A.: CDI systems are stably maintained by a cell-contact mediated surveillance mechanism. *PLoS Genetics,* **12**, e1006145 (2016)
87. Ruhe Z.C., Nguyen J.Y., Xiong J., Koskiniemi S., Beck C.M., Perkins B.R., Low D.A., Hayes C.S.: CdiA effectors use modular receptor-binding domains to recognize target bacteria. *mBio*, **8**, . DOI:10.1128/mBio.00290-17 (2017)
88. Ruhe Z.C., Townsley L., Wallace A.B., King A., Van der Woude M.W., Low D.A., Yildiz F.H., Hayes C.S.: CdiA promotes receptor-independent intercellular adhesion. *Mol. Microbiol.* **98**, 175–192 (2015)
89. Ruhe Z.C., Wallace A.B., Low D.A., Hayes C.S.: Receptor polymorphism restricts contact-dependent growth inhibition to members of the same species. *mBio*, **4**: DOI:10.1128/mBio.00480-13 (2013)
90. Ruiz F.M., Santillana E., Spínola-Amilibia M., Torreira E., Culebras E., Romero A.: Crystal structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: A component of the type VI secretion system. *PLoS ONE*, **10**, e0129691 (2015)
91. Russell A.B., Hood R.D., Bui N.K., Leroux M., Vollmer W., Mougous J.D.: Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, **475**: 343–349 (2011)
92. Russell A.B., LeRoux M., Hathazi K., Agnello D.M., Ishikawa T., Wiggins P.A., Wai S.N., Mougous J.D.: Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, **496**, 508–512 (2013)
93. Saak C.C., Gibbs K.A.: The self-identity protein IdsD is communicated between cells in swarming *Proteus mirabilis* colonies. *J. Bacteriol.* **198**, 3278–3286 (2016)
94. Saak C.C., Zepeda-Rivera M.A., Gibbs K.A.: A single point mutation in a TssB / VipA homolog disrupts sheath formation in the type VI secretion system of *Proteus mirabilis*. *PLoS ONE*, 12, e0184797 (2017)
95. Salomon D., Orth K.: Type VI secretion system. *Curr. Biol.* **25**, DOI:10.1016/j.cub.2015.02.031 (2015)
96. Sana T.G., Hachani A., Bucior I., Soscia C., Garvis S., Termine E., Egel J., Filloux A., Bleves S.: The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur and modulates internalization in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 27095–27105 (2012)
97. Satpathy S., Sen S.K., Pattanaik S., Raut S.: Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **7**, 56–66 (2016)
98. Sha J., Rosenzweig J.A., Kozlova E.V., Wang S., Erova T.E., Kirtley M.L., van Lier C.J., Chopra A.K.: Evaluation of the roles played by Hcp and VgrG type 6 secretion system effectors in *Aeromonas hydrophila* SSU pathogenesis. *Microbiology*, **159**, 1120–1135 (2013)
99. Shneider M.M., Buth S.A., Ho B.T., Basler M., Mekalanos J.J., Leiman P.G.: PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature,* **500**, 350–353 (2013)
100. Silverman J.M., Agnello D.M., Zheng H., Andrews B.T., Li M., Catalano C.E., Gonen T., Mougous J.D.: Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. *Mol. Cell*, **51**, 584–593 (2013)
101. Silverman J.M., Brunet Y.R., Cascales E., Mougous J.D.: Structure and regulation of the Type VI Secretion System. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 453–472 (2012)
102. Stubbendieck R.M., Straight P.D.: Multifaceted interfaces of bacterial competition. *J. Bacteriol.* **198**, 2145–2155 (2016)
103. Tan K., Johnson P.M., Stols L., Boubion B., Eschenfeldt W., Babnigg G., Hayes C.S., Joachimiak A., Goulding C.W.: The structure of a contact-dependent growth-inhibition (CDI) immunity protein from *Neisseria meningitidis* MC58. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **71**, 702–709 (2015)
104. Tang J.Y., Bullen N.P., Ahmad S., Whitney J.C.: Diverse NADase effector families mediate interbacterial antagonism via the type VI secretion system. *J. Biol. Chem.* **2**, 1504–1514 (2017)

105. Tian Y., Zhao Y., Wu X., Liu F., Hu B., Walcott R.R.: The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 38–47 (2015)
106. Unterweger D., Miyata S.T., Bachmann V., Brooks T.M., Mullins T., Kostiuk B., Provenzano D., Pukatzki S.: The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nat. Commun.* **5**, DOI:10.1038/ncomms4549 (2014)
107. Van Ulsen P., Rahman S., Jong W.S.P., Daleke-Schermerhorn M.H., Luirink J.: Type V secretion: From biogenesis to biotechnology. *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 1592–1611 (2014)
108. Vassallo C.N., Cao P., Conklin A., Finkelstein H., Hayes C.S., Wall D.: Infectious polymorphic toxins delivered by outer membrane exchange discriminate kin in myxobacteria. *eLife*, **6**, DOI:10.7554/eLife.29397 (2017)
109. Velicer G.J., Plucain J.: Evolution: Bacterial territoriality as a byproduct of kin discriminatory warfare. *Curr. Biol.* **26**, DOI:10.1016/j.cub.2016.03.033 (2016)
110. Wang L., Qiu J. i wsp.: Cell density- and quorum sensing--dependent expression of type VI secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS ONE*, **8**, e73363 (2013)
111. Webb J.S., Nikolakakis K.C., Willett J.L.E., Aoki S.K., Hayes C.S., Low D.A.: Delivery of CdiA nuclease toxins into target cells during contact-dependent growth inhibition. *PLoS ONE*, **8**, e57609 (2013)
112. Weber B., Hasic M., Chen C., Wai S.N., Milton D.L.: Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. *Environ. Microbiol.* **11**, 3018–3028 (2009)
113. Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L.: Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export. *mBio*, **4**, DOI:10.1128/mBio.00374-13.Editor (2013)
114. Whitney J.C., Mougous J.D. i wsp.: Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Mol. Microbiol.* **92**, 529–542 (2014)
115. Whitney J.C., Chou S., Russell A.B., Biboy J., Gardiner T.E., Ferrin M.A., Brittnacher M., Vollmer W., Mougous J.D.: Identification, structure, and function of a novel type VI secretion peptidoglycan glycoside hydrolase effector-immunity pair. *J. Biol. Chem.* **288**, 26616–26624 (2013)
116. Whitney J.C., Mougous J.D. i wsp.: A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram--positive bacteria. *eLife*, **6**, DOI:10.7554/eLife.26938 (2017)
117. Willett J.L.E., Gucinski G.C., Fatherree J.P., Low D.A., Hayes C.S.: Contact-dependent growth inhibition toxins exploit multiple independent cell-entry pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 11341–1346 (2015)
118. Willett J.L.E., Ruhe Z.C., Goulding C.W., Low D.A., Hayes C.S.: Contact-dependent growth inhibition (CDI) and CdiA/CdiB two-partner secretion proteins. *J. Mol. Biol.* **427**, 3754–4765 (2015)
119. Yang L., Liu Y., Wu H., Høiby N., Molin S., Song Z.: Current understanding of multi-species biofilms. *Int. J. Oral Sci.* **3**, 74–81 (2011)
120. Zhang D., de Souza R.F., Anantharaman V., Iyer L.M., Aravind L.: Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. *Biol. Direct*, **7**, DOI:10.1186/1745-6150-7-18 (2012)
121. Zhang W., Xu S., Li J., Shen X., Wang Y., Yuan Z.: Modulation of a thermoregulated type VI secretion system by ahl-dependent quorum sensing in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Arch. Microbiol.* **193**, 351–363 (2011)
122. Zheng J., Shin O.S., Cameron D.E., Mekalanos J.J.: Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 21128–21133 (2010)
123. Zoued A., Brunet Y.R., Durand E., Aschtgen M.S., Logger L., Douzi B., Journet L., Cambillau C., Cascales E.: Architecture and assembly of the type VI secretion system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1664–1673 (2014)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 374–384
http://www.pm.microbiology.pl

CHARAKTERYSTYKA I FUNKCJE HYDROFOBIN ORAZ ICH WYKORZYSTANIE W PRZEMYŚLE

Łukasz P. Tymiński[1], Zuzanna Znajewska[1], Grażyna B. Dąbrowska[1]*

[1] Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło w maju, zaakceptowano we wrześniu 2018 r.

Streszczenie: Hydrofobiny stanowią rodzinę powierzchniowo czynnych białek wytwarzanych przez grzyby strzępkowe i pełniących wiele istotnych funkcji w ich cyklu rozwojowym. Białka o właściwościach i funkcjach podobnych do hydrofobin odkryto również u bakterii. Hydrofobiny charakteryzuje specyficzne ułożeniem reszt cysteinowych, które w sekwencji aminokwasowej tworzą cztery mostki dwusiarczkowe. Ta charakterystyczna budowa nadaje im hydrofobowe właściwości, dzięki czemu uzyskują zdolność do spontanicznego formowania się w amfipatyczne monowarstwy pomiędzy hydrofobowym a hydrofilowym środowiskiem. Unikatowe właściwości hydrofobin sprawiają, że cieszą się coraz większym zainteresowaniem pod kątem ich potencjalnego zastosowania w przemyśle. Opracowywane są nowe sposoby ich wykorzystania w różnych gałęziach gospodarki. Szerokie zastosowanie odnajdują w branży spożywczej, przemyśle farmaceutycznym, ale także w metodach biologii molekularnej.

1. Wprowadzenie. 2. Klasyfikacja hydrofobin. 3. Struktura genów i białek hydrofobin. 4. Formowanie się filmu hydrofobinowego. 5. Produkcja, wydzielanie i formowanie się hydrofobin w środowisku naturalnym. 6. Właściwości hydrofobin. 7. Zastosowanie hydrofobin w różnych dziedzinach. 8. Przemysłowa produkcja hydrofobin. 9. Podsumowanie

CHARACTERISTICS AND FUNCTIONS OF HYDROPHOBINS AND THEIR USE IN INDUSTRY

Abstract: Hydrophobins are surface active proteins produced by filamentous fungi. They play a role in fungal growth and their life cycle. Proteins with similar properties have been also found in prokaryotic organisms. Hydrophobins are characterized by a specific arrangement of cysteine residues, which form four disulfide bridges in the amino acid sequence. This construction gives hydrophobins their hydrophobic properties, allowing for their spontaneous assembly into amphipathic monolayers at hydrophobic-hydrophilic interfaces. These unique properties of hydrophobins make them more and more popular with regard to their potential application in industry. New ways of using hydrofobins in various branches of the business sector are being developed. Hydrofobins are already widely used in the food industry, pharmaceutical industry, as well as molecular biology.

1. Introduction. 2. Classification of hydrophobins. 3. Structure of hydrophobin genes and proteins. 4. Formation of hydrophobin film. 5. Production, secretion and formation of hydrophobins in the natural environment. 6. Properties of hydrophobins. 7. The use of hydrophobins in various fields. 8. Manufacturing of hydrophobins. 9. Summary

Słowa kluczowe: grzyby, hydrofobiny, stres, film hydrofobinowy
Key words: fungi, hydrophobins, stress, hydrophobin film

1. Wstęp

Hydrofobiny stanowią rodzinę białek charakteryzujących się niewielka masą cząsteczkową (od 7 do 15 kDa) i obecnością licznych cystein. Wytwarzane są głównie przez grzyby strzępkowe [9, 46, 66]. Charakterystyczną cechą hydrofobin jest specyficzne ułożeniem reszt cysteinowch, które w sekwencji aminokwasowej tworzą cztery mostki dwusiarczkowe (Ryc. 1) [9, 19]. Poza tym hydrofobiny w swojej sekwencji nie zawierają innych konserwowanych ewolucyjnie regionów [53]. Są to białka zewnątrzkomórkowe, powierzchniowo czynne, które pełnią wiele funkcji w rozwoju oraz cyklu życiowym grzybów [59]. Hydrofobiny są zaangażowane w powstawanie hydrofobowych struktur, takich jak grzybnia powietrzna, owocniki i zarodniki. Dzięki tym białkom komórki grzybni posiadają właściwości hydrofobowe, co umożliwia im przyleganie do różnych powierzchni. Wykazano, że hydrofobiny mogą również pełnić funkcje cząsteczek sygnałowych [80, 84]. Najbardziej charakterystyczną cechą hydrofobin jest posiadanie zdolności do spontanicznego formowania się w amfipatyczne monowarstwy pomiędzy hydrofobowym a hydrofilowym środowiskiem [42]. Tak utworzone powierzchnie wykazują specyficzne właściwości fizyczne, posiadają zdolność zmiany charakteru różnych powierzchni z hydrofobowego na hydrofilowy i odwrotnie [64, 79, 80].

Pierwsze geny kodujące hydrofobiny zostały opisane u *Schizophyllum commune* w 1991 roku przez zespół Wesselsa podczas badań nad zmianami ekspresji genów w trakcie formowania się zarodni tego grzyba. Nazwa

* Autor korespondencyjny: dr hab. Grażyna B. Dąbrowska, Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; e-mail: browsk@umk.pl

```
Bs1A      MKRKLLSSLAISALSLGLLVSAPTASFAAESTSTKAHTESTMRTQSTASLFATITGASKT
HFB2      ------------------------------------------------------------

Bs1A      EWSFSDIELTYRPNTLLSLGVMEFTLPSGFTANTKDTLNGNALRTTQILNNGKTVRVPLA
HFB2      --------MQFFAVALFATSALAAVCPTGLFSNPLC------------------CATNV
                          * *   *

Bs1A      LDLLGAGEFKLKLNNKTLPAAGTYTFRAENKSLSIGNKFYAEASIDVAKRSTPPTQPCGC
HFB2      LDLIGVDCKT-----P-------------TIAVDTGAIFQAHC-------ASKGSKPLCC
          *** *                                 *  * *               *  *

Bs1A      N-----------------
HFB2      VAPVADQALLCQKAIGTF
```

Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowych hydrofobin

Porównanie sekwencji HFB2 *Trichoderma reesei* (nr GeneBank NCBI: XP_006962048.1) z bakteryjnym białkiem Bs1A *Bacillus subtilis* (WP_003243556.1) wykonane przy użyciu programu ClustalW.

„hydrofobiny" nawiązuje do obecnych w sekwencji tych białek licznych aminokwasów hydrofobowych [1, 79, 81, 83].

Białka pełniące podobne funkcje i wykazujące zbliżone właściwości do hydrofobin zostały odkryte również wśród organizmów prokariotycznych. Przykładem jest białko BslA wytwarzane przez Gram-dodatnie bakterie *Bacillus subtilis*. Chociaż białko to pełni u bakterii funkcje podobne do hydrofobin, jednak wykazuje istotne różnice w sekwencji aminokwasowej [3, 5, 6, 27, 71] (Ryc. 1). Homologia jest nieznaczna, nie występuje w sekwencjach aminokwasowych.

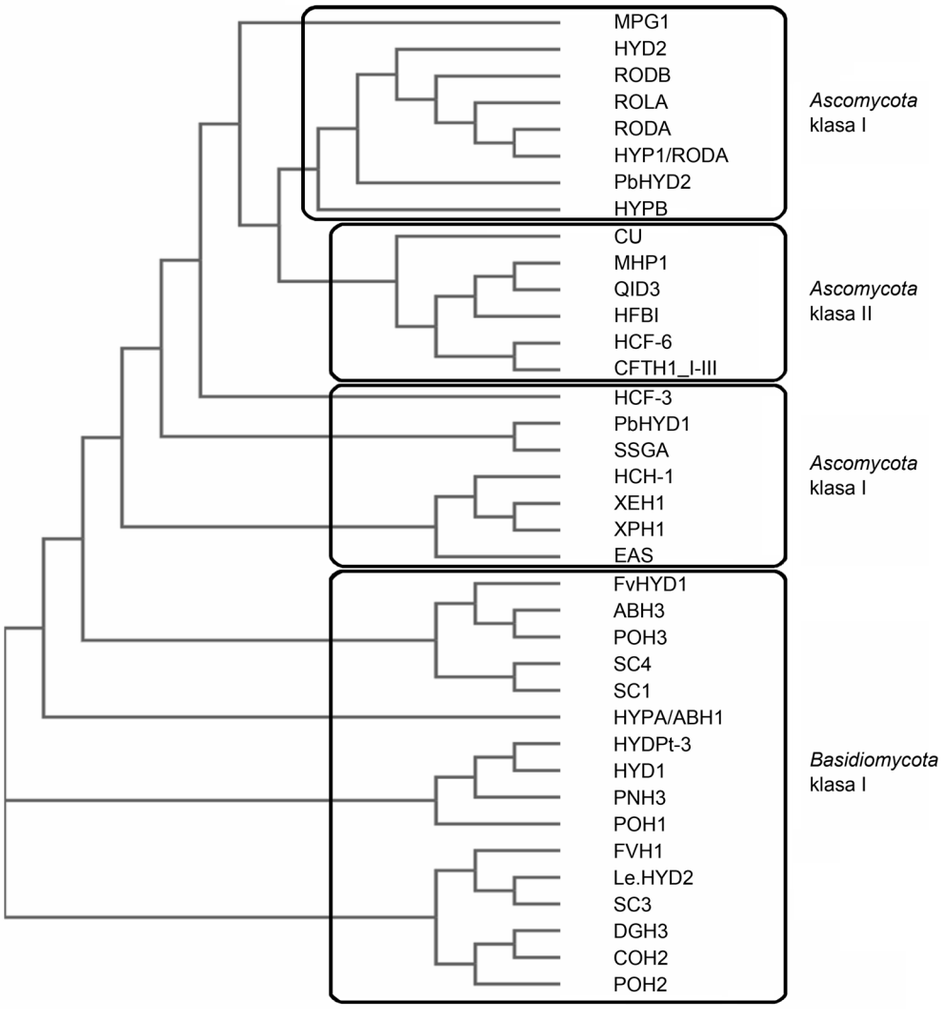
Początkowo nazwy poszczególnych hydrofobin pochodziły od nazw organizmów, u których zostały zidentyfikowane. Oprócz akronimów genów hydrofobin mających oczywiste pochodzenie, jak w przypadku *Agaricus bisporus* (gen hydrofobiny *ABH1*), pozostałe nazewnictwo koncentruje się bardziej na mutacjach w genach, powodujących zmiany w fenotypie dzikim. Przykładem mogą być mutacje w genach *rodA* (*Aspergillus nidulans*) i *eas* (*Neurospora crassa*), których konsekwencją jest utrata przez zarodniki grzybów właściwości hydrofobowych, co skutkuje zbijaniem się ich w konglomeraty [29].

W wyniku przeszukania sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov) za pomocą hasła „hydrophobin" otrzymuje się ponad 700 sekwencji nukleotydowych i ponad 6000 sekwencji aminokwasowych kodujących hydrofobiny (luty 2018). Wpisując takie samo hasło w bazie UniProt (www.uniprot.org) otrzymuje się prawie 3000 wyników, w tym ponad 1200 bezpośrednio odnoszących się do hydrofobin (luty 2018). Są to sekwencje zidentyfikowane u grzybów z typów workowców (*Ascomycota*) i podstawczaków (*Basidiomycota*) [34]. Na przykład u saprofitycznych grzybów *Trichoderma* spp. w bazie NCBI obecnie jest zdeponowanych 25 sekwencji nukleotydowych kodujących hydrofobiny (luty 2018). Niektóre źródła podają dowody na występowanie hydrofobin również u przedstawicieli typu sprzężniowców (*Zygomycota*). de Vries i wsp. w pracy z 1993 roku dowiedli, że białka o podobnych właściwościach do hydrofobin występują także u pleśniaka białego (*Mucor mucedo*) [20].

W środowisku naturalnym podczas wzrostu grzybów hydrofobiny są uwalniane do wolnej wodnej przestrzeni otaczającej grzybnię. W sytuacjach ograniczonego dostępu do składników odżywczych lub w czasie stresu fizjologicznego obecność hydrofobin wpływa na zmianę napięcia powierzchniowego wody. Białka te obniżają napięcie powierzchniowe prawie dwukrotnie z 70 mN/m do mniej niż 30 mN/m [33]. Takie zjawisko pomaga strzępkom powietrznym przełamywać barierę woda-powietrze, a co za tym idzie, rozsiewać spory w celu kolonizacji nowych przestrzeni. Hydrofobiny grzybów nawet ze sobą spokrewnionych posiadają specyficzne właściwości i pełnią wyspecjalizowane funkcje, niekoniecznie ściśle powiązane z momentem cyklu życiowego, w którym są wytwarzane [12, 26].

2. Klasyfikacja hydrofobin

Bazując na różnicach w rozpuszczalności, ułożeniu reszt cysteinowych oraz właściwościach fizycznych, hydrofobiny zostały podzielone na klasę I i klasę II [53]. Białka należące do klasy I są bardzo słabo rozpuszczalne w wodnych roztworach. Jedynie silne stężone kwasy, jak kwas trifluorooctowy (TFA) lub kwas mrówkowy mogą zdysocjować te białka [33, 34]. Monowarstwy składające się z hydrofobin klasy pierwszej zawierają wysoce uporządkowane struktury rdzenia białkowego, zwane

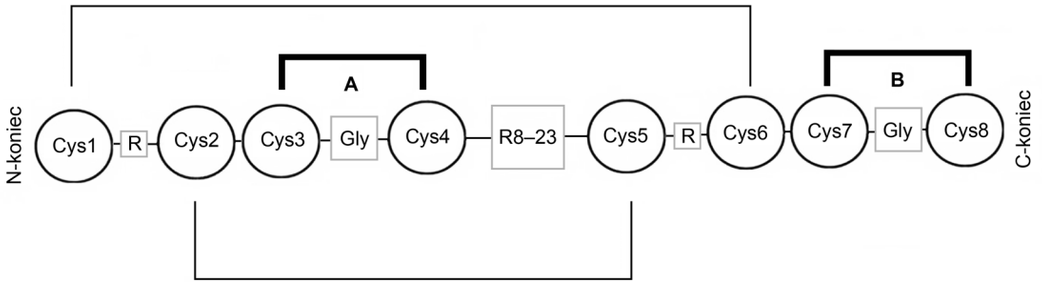


Ryc. 2. Analiza filogenetyczna przykładowych hydrofobin

Zilustrowano analizę filogenetyczną hydrofobin I i II, wytwarzanych przez przedstawicieli należących do *Ascomycota* i *Basidiomycota*. Drzewo filogenetyczne wykonane w programie ClustalW na podstawie sekwencji aminokwasowych zdeponowanych w GeneBank NCBI: MHP1 *Magnaporthe grisea* (XP_003714057.1), HYD2 *Gibberella moniliformis* (AAO16868.1), RODB *Aspergillus fumigatus* (XP_753093.1), ROLA *Aspergillus oryzae* (XP_001824881.1), RODA *Emericella nidulans* (XP_682072.1), HYP1/RODA *A. fumigatus* (XP_001259730.1), PbHYD2 *Paracoccidioides brasiliensis* (XP_010762860.1), HYPB *A. fumigatus* (XP_001727202.1), CU *Ophiostoma ulmi* (CAB02148.1), MHP1 *M. grisea* (XP_003714057.1), QID3 *Trichoderma harzianum* (P52755.1), HFBI *Trichoderma reesei* (XP_006964181.1), HCF-6 *Cladosporium fulvum* (CAC27407.1), CFTH1_I-III *Claviceps fusiformis* (Q9UVI4.1), HCF-3 *C. fulvum* (CAD92803.1), PbHYD1 *P. brasiliensis* (ACF72690.1), SSGA *Metarhizium anisopliae* (XP_007825920.1), HCH-1 *Cladosporium herbarum* (Q8NIN9.1), XEH1 *Xanthoria ectaneoides* (CAC08469.1), XPH1 *Xanthoria parietina* (CAC43386.1), EAS *Neurospora crassa* (XP_963300.1), FvHYD1 *Flammulina velutipes* (ADX07307.1), ABH3 *Agaricus bisporus* (XP_006461631.1), POH3 *Pleurotus ostreatus* (NCBI: CAA76494.1), SC4 *Schizophyllum commune* (XP_003038794.1), SC1 *S. commune* (XP_003038791.1), HYPA/ABH1 *A. bisporus* (XP_006457847.1), HYDPt-3 *Pisolithus tinctorius* (AAC95356.1), PNH3 *Pholiota nameko* (BAB84547.1), FVH1 *Flammulina velutipes* (ANH11478.1), Le.HYD2 *Lentinula edodes* (AAG00901.1), SC3 *S. commune* (KIJ48515.1), DGH3 *Dictyonema glabratum* (CAC86006.1), COH2 *Coprinus cinereus* (XP_001834449.1), POH2 *P. ostreatus* (CAA74987.1).

powierzchniami rurkowatymi. Białka te dają pozytywne wyniki w reakcji z barwnikami, takimi jak czerwień Kongo i tioflawina T, które powszechnie używane są do uwidaczniania złóż amyloidów [44]. Hydrofobiny klasy II są rozpuszczalne w wodnych roztworach organicznych rozpuszczalników, takich jak etanol lub sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) [29]. Hyrofobiny klasy I zostały opisane zarówno u grzybów typu *Ascomycota* jak i *Basidiomycota*, a białka klasy II jak dotąd zostały znalezione tylko u przedstawicieli *Ascomycota* [33] (Ryc. 2). Należy zwrócić uwagę na to, że w miarę coraz niższych kosztów sekwencjonowania każdego roku poznawane są kolejne genomy grzybów, dlatego też obecny podział może stać się nieaktualny. Przeszukiwanie baz danych potwierdza, że hyrofobiny klasy II występują tylko u *Ascomycota* jako jednolita grupa w drzewie filogenetycznym [23, 59] (Ryc. 2). Przypuszcza się, że białka klasy II wyewoluowały niezależnie od hydrofobin klasy I, co jest przykładem konwergencji [29].

Klasa I hydrofobin ze względu na typ grzybów, które je wytwarzają, podzielona jest na dwie podgrupy



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie struktury hydrofobin z regionami hydrofobowymi
Elementy hydfrofobowe oznaczono literami A i B, w oparciu o [20].

– klasa Ia reprezentowana przez *Ascomycota* oraz klasa Ib, reprezentowana przez *Basidiomycota.* Klasę Ia cechuje większe zróżnicowanie długości sekwencji genów kodujących te białka. Hydrofobowość większości białek klasy Ib jest średnio wyższa o 60% w porównaniu z hydrofobinami klasy Ia i klasy II [23, 59].

3. Struktura genów i białek hydrofobin

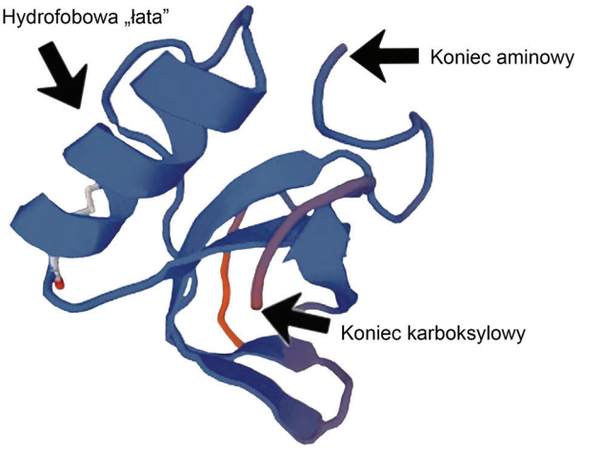
W sekwencjach aminokwasowych kodujących hydrofobiny obecnych jest 8 konserwowanych ewolucyjnie reszt cysteinowych. Hydrofobiny klasy I składają się ze 100–125 aminokwasów i mogą ulegać glikozylacji. Białka należące do klasy II hydrofobin są znacznie krótsze i zawierają średnio od 50 do 100 reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym [55, 65]. Poza konserwowanymi resztami cysteinowymi, hydrofobiny wykazują tylko niewielkie homologie na poziomie aminokwasowym. Pomimo to, tworzą bardzo podobny wzór hydrofobowy (Ryc. 3) [52, 53, 86].

Hydrofobiny są białkami charakteryzującymi się unikatową konformacją poprzez specyficzne ułożenie hydrofobowych, hydofilowych i obojętnych aminokwasów [53]. W swojej strukturze białka te zawierają cztery mostki dwusiarczkowe pomiędzy ośmioma resztami cysteinowymi: Cys1-Cys6, Cys2-Cys5, Cys3-Cys4 oraz Cys7-Cys8 [61]. Taki układ tworzy dwie pary pętli oddzielonych regionem łącznikowym pomiędzy 8 a 23 resztą aminokwasową (R8-R23) (Ryc. 3).

Słabo konserwowane reszty aminokwasowe (R) znajdują się pomiędzy aminokwasami hydrofobowymi. Pierwsza pętla zazwyczaj zawiera 5–9 reszt aminokwasowych. Wielkość drugiej pętli jest mniej konserwowana, jednak zawsze zawiera przynajmniej jedną resztę glicyny (Gly), która zwykle przylega do hydrofobowych aminokwasów (Ryc. 3). W hydrofobinach klas I i II obecne są części hydrofobowe (A i B), które w trzeciorzędowej strukturze przyjmują postać dwóch β-harmonijek położonymi pomiędzy resztami cysteinowymi Cys3-Cys4 i Cys7-Cys8. Hydrofilowa część przyjmująca konformację α-helisy pomiędzy resztami cysteinowymi Cys4-Cys5 obecna jest tylko u białek klasy II [10, 30].

Badania nad strukturą białka HFBII – hydrofobiny klasy II (wyizolowanego z *Trichoderma reesei*) – prowadzone metodą krystalizacji, wykazały trójwymiarową strukturę tych cząsteczek przyjmującą globularny kształt o średnicy wynoszącej 2 nm [86]. W tej cząsteczce rdzeń stanowią dwa β-skręty (struktura „spinki do włosów"), które wiążę się ze sobą i formują antyrównoległą β-harmonijkę, ta zaś organizuje się w strukturę o beczkowatym kształcie, zwaną „łatą hydrofobową" [35, 52] (Ryc. 4).

Badania z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) nad hydrofobinami EAS wyizolowanym z *N. crassa* i SC3 z *S. commune* (rozszczepka pospolita) należącymi do klasy I (HFBI), wykazały bardzo podobne ułożenie mostków dwusiarczkowych do tych obecnych w hydrofobinach HFBII, chociaż cechujące się większą różnorodnością [35, 52]. Mostki dwusiarczkowe są istotnym elementem struktury hydrofobin, jednak hydrofobiny klasy I zachowują swoją funkcjonalność nawet po usunięciu mostków bądź ich zablokowaniu [52].



Ryc. 4. Model hydrofobiny HFBII *T. reesei*
Model *T. reesei* QM6a wykonany w programie SWISS-MODEL z wykorzystaniem sekwencji z Genebank NCBI (numer dostępu XP_006962048.1).

4. Formowanie się filmu hydrofobinowego

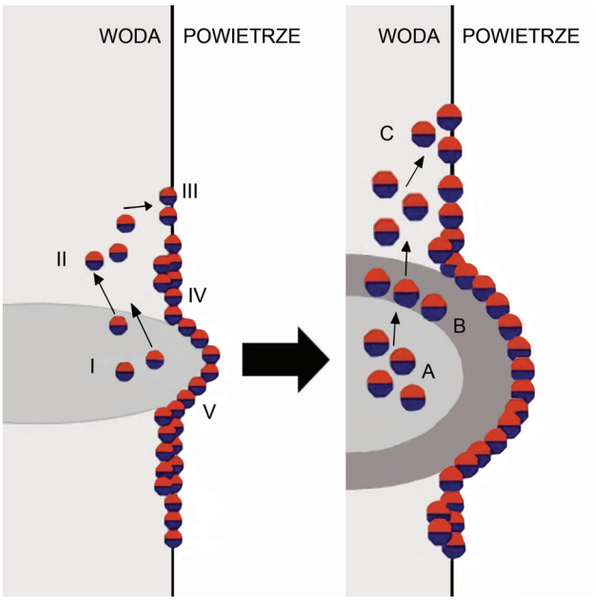
W środowisku naturalnym hydrofobiny występują w postaci monomerów wolno rozproszonych w roztworach, jednak bardziej prawdopodobnym jest formowanie się tych białek w słabo związane oligomery. Opisywane jest tworzenie się oligomerów, ich wzajemne relacje i kinetyka, których ostateczne formowanie się w warstwy następuje, gdy znajdą się na granicy faz pomiędzy powietrzem i wodą lub pomiędzy olejem a wodą [30]. Oligomery tworzą się w roztworze, są to głównie dimery lub tetramery, które układają się tak, że hydrofobowe regiony białek są niedostępne dla wodnego rozpuszczalnika. Formowanie się i wewnętrzna konwersja pomiędzy oligomerycznymi formami hydrofobin prowadzi do ich zagęszczania. Jest to proces przebiegający podobnie jak formowanie się warstw białek na granicy faz [48, 49]. Białko HFBII *T. reesei* wykazuje mniejsze zdolności do oligomeryzacji, niż inne formy, a zatem ma wyższy wskaźnik wejścia i polimeryzacji [17, 52].

Oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe są stosunkowo słabe, jednakże bardzo istotne, gdyż odpowiadają za dynamikę tworzenia się kompletnych warstw hydrofobowych. W przeciwieństwie do amfipatycznych detergentów i środków powierzchniowo czynnych, w nadmiernych stężeniach hydrofobiny tworzą struktury polimeryczne [30, 59].

Dwie klasy hydrofobin, reprezentowane przez białko SC3 z *S. commune* [19, 76] oraz białko HFBII z *T. reesei* [40, 41] najlepiej obrazują różnice w mechanizmach polimeryzacji. Trudniej rozpuszczalna klasa I (białko SC3) wykazuje bardziej złożony sposób asocjacji i polimeryzacji niż bardziej stabilny film białkowy tworzony przez hydrofobiny klasy II [40, 41, 52, 72]. Przede wszystkim, klasa I tworzy etap pośredni ze zwiększoną liczbą tworzonych struktur w formie α-helisy przed rozwinięciem się struktur zdominowanych przez formy β-harmonijki. Proces ten jest powolny, a jego wynikiem są powstające podłużne warstwy białka [77]. Dla porównania odkładanie się i krzyżowe wiązanie białek klasy II hydrofobin jest procesem szybkim i nie wykazuje żadnych zmian w konformacji [18, 35, 40, 41], a powstające wiązania krzyżowe powodują niemalże natychmiastowe powstanie filmu białkowego. Przypuszczalnie mechanizmy pośrednie podobne HFBI dotyczą większości hydrofobin [35, 40, 41, 72].

5. Produkcja, wydzielanie i formowanie się hydrofobin w środowisku naturalnym

Jak już wcześniej wspomniano, hydrofobiny pełnią istotną rolę w rozwoju grzybów strzępkowych. Jedną z najważniejszych funkcji jest wspomaganie takich



Ryc. 5. Schematycznie pokazane formowanie się filmu hydrofobinowego
Ilustrację wykonano w oparciu o [14].

struktur jak strzępki powietrzne i spory w kolonizowaniu nowych środowisk. Ekspresja genów hydrofobin prowadzi do wydzielania tych białek na zewnątrz komórki do środowiska, co następuje w wierzchołku rosnącej strzępki (I) (Ryc. 5I). Następnie hydrofobiny są odkładane w postaci monomerów lub w niektórych przypadkach w formie dimerów i trimerów (Ryc. 5II) [14, 28, 47]. Wydzielone na zewnątrz strzępki poszczególne cząsteczki zaczynają odkładać się na granicy faz między wodą a powietrzem (Ryc. 5III), gdzie dzięki swojej zdolności do samoistnego układania się w monowarstwy i wytwarzania wiązań krzyżowych pomiędzy nimi, tworzą białkowy film (Ryc. 5IV). Zredukowane w ten sposób napięcie powierzchniowe umożliwia ostateczne wydostanie się strzępki ponad powierzchnię wody (Ryc. 5V) [13, 86].

Tak uformowana warstwa ma kilka podstawowych właściwości (Ryc. 5VI). Jest amfipatyczna, elastyczna, posiada dużą wytrzymałość oraz stanowi skuteczne ograniczenie transportu dużych cząsteczek. W wydzielaniu hydrofobin na zewnątrz grzybni najprawdopodobniej uczestniczą pęcherzyki, które formują się w szczytowych częściach strzępek. Wciąż niejasny jest mechanizm przedostawania się monomerów hydrofobin poza ścianę komórkową [82].

Wyróżnić można trzy prawdopodobne nagromadzenia hydrofobin (Ryc. 5). Pierwsze reprezentuje wewnętrzne nagromadzenie hydrofobin, którego stężenie zależne od ekspresji kodujących je genów (Ryc. 5A). Następnie wzrasta nagromadzenie potencjalnie reaktywnych białek na powierzchni błony komórkowej, ale poniżej ściany komórkowej (Ryc. 5B). Gradient stężeń

hydrofobin zapewnia przepływ monomerów tych białek do środowiska wodnego lub dowolnego innego środowiska zewnętrznego (Ryc. 5C) [8, 14].

6. Właściwości hydrofobin

Hydrofobiny uważane są za najbardziej powierzchniowo czynne białka spośród wszystkich dotąd odkrytych [60]. Wszystkie hydrofobiny mają zdolność otaczania różnych powierzchni i obniżania napięcia powierzchniowego. W porównaniu do innych surfaktantów o mniejszej masie cząsteczkowej potrzebna jest mniejsza ilość hydrofobin do osiągnięcia określonego niskiego napięcia powierzchniowego [60]. Najważniejszą właściwością hydrofobin jest zdolność samodzielnego formowania się filmu białkowego złożonego z tych cząsteczek na powierzchniach hydrofobowych lub hydrofilowych oraz powierzchniach międzyfazowych pomiędzy różnymi ośrodkami [10]. Te wytrzymałe, uporządkowane i lepko-sprężyste błony są bardzo istotne w procesie rozrastania się grzybni [30]. W przypadku hydrofobin klasy II błony powierzchniowe powstające na granicy faz woda-powietrze, składające się z filmu hydrofobinowego, przyjmują postać pojedynczych warstw. W przypadku białek klasy I częstym jest formowanie się błon wielowarstwowych [35].

Film hydrofobinowy najczęściej przyjmuje formę powierzchni rurkowatych, a zdolność do jej formowania na granicy faz woda-powietrze jest jedną z najwcześniejszych obserwacji dokonanych podczas badań nad hydrofobinami klasy I [81]. Włókna rurkowate wykazują duże analogie do włókien amyloidowych, które są białkami o zmienionej konformacji. Wszystkie amyloidy, podobnie do hydrofobin, posiadają w swojej budowie charakterystyczną strukturę β-harmonijki. Szczególnie charakterystyczna jest agregacja we włókna amyloidowe białek klasy II [56]. Badania prowadzone nad hydrofobiną HGFI pochodzącą z żagwicy listkowatej (*Grifola frondosa*) oraz hydrofobinami wytwarzanymi przez boczniaka ostrygowatego (*Pleurotus ostreatus*) z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM, Atomic Force Microscope) wykazały, że długość włókien rurkowatych wynosi od 50 do 105 nm, a szerokość waha się w zakresie od 19 do 24 nm. Powierzchnie rurkowate przyjmują formę podwójnej warstwy [23, 41, 49, 88, 89]. W 2013 roku Stanimirova i wsp. [68] przeprowadzili szereg doświadczeń mających na celu wykazanie zmian w ciśnieniu powierzchniowym podczas formowania się filmu hydrofobinowego. Przy użyciu urządzenia zwanego rynną Langmuir'a-Blodgett'a (Langmuir-Blodgett trough) analizowano białko HFBII *T. reesei*. Stopniowo zwiększano ciśnienie wywierane na roztwór zawierający hydrofobiny, a za pomocą mikroskopii sił atomowych obrazowano powstający film hydrofobinowy i wzajemne relacje pomiędzy cząsteczkami [52].

Eksperymenty badające zdolności hydrofobin do pokrywania różnych powierzchni, prowadzone na płytkach mikrotitracyjnych z barwnikiem nieorganicznym stosowanym jako marker (np. Ponceau S), wykazały znaczne właściwości adhezyjne hydrofobin [25]. Jednak w zależności od klasy hydrofobiny wykazują istotne różnice w zdolności do wiązania się tych cząsteczek do podłoża [3]. Hydrofobiny klasy I przylegają do powierzchni bardzo silnie, natomiast białka należące do klasy II są w stanie oddzielić się od podłoża znacznie łatwiej.

Pomiar kąta zwilżania (WCA, Water Contact Angle) podczas pokrywania warstwą hydrofobin powierzchni płyt miki oraz szkła silikonowanego daje różne wyniki, od znaczącego wzrostu na powierzchni miki do silnej redukcji na powierzchni szkła. Im mniejszy kąt zwilżania, tym hydrofobina wykazuje większe właściwości hydrofobowe [24, 70].

Hydrofobiny nie wykazują właściwości toksycznych, cytotoksycznych czy immunogennych u ludzi, jeżeli dostają się do organizmu podczas spożywania grzybów jadalnych. Jednakże poprzez otaczanie struktur takich jak spory, hydrofobiny stanowią tarczę dla antygenów, a tym samym chronią je przed ludzkim układem immunologicznym [32].

Powierzchniowe warstwy rurkowate pełnią kluczową rolę w maskowaniu immunogenności spor [22, 32]. Poprzez otaczanie powierzchni spor nadają im immunologiczną obojętność i powodują, że charakterystyczne i powtarzalne wzorce molekularne związane z elementami budowy i metabolizmu patogenów (PAMP, Pathogen Associated Molecular Patterns) nie są rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego nieswoistego oraz swoistego. Co za tym idzie, hydrofobinowe warstwy zapobiegają aktywacji układu immunologicznego gospodarza, przeciwdziałają powstawaniu stanów zapalnych i uszkodzeniu tkanek. Przypuszcza się, że powierzchnie rurkowate, które pokrywają spory zarówno grzybów będących patogenami, jak i tych nie wywołujących chorób, w taki sam sposób zabezpieczają je przed rozpoznaniem przez układ odpornościowy [28, 41, 87].

7. Zastosowanie hydrofobin w różnych gałęziach przemysłu

Hydrofobiny pełnią bardzo różnorodne funkcje biologiczne, dlatego też znajdują szerokie przemysłowe wykorzystanie. W oparciu o właściwości amfipatyczne i zdolność do samoorganizowania się w warstwy hydrofobinowe, białka te mogą znaleźć zastosowanie jako: biosurfaktanty, emulgatory, elementy biomateriałów,

biosensorów i elektrod. Mogą też pełnić istotne funkcje w takich sektorach przemysłu jak: spożywczy, kosmetyczny, nanotechnologiczny, farmaceutyczny i browarniczy. Hydrofobiny posiadają zdolność modyfikowania hydrofobowych i hydrofilowych powierzchni, np. teflonu i szkła [33, 57].

Ze względu na brak właściwości toksycznych, cytotoksycznych i immunogennych hydrofobiny mogą stać się powszechnie wykorzystywanymi składnikami powierzchniowo czynnymi w przemyśle spożywczym [14, 51, 54, 67, 73]. Białka te posiadają zdolność stabilizowania kropli oleju i mogą działać tak samo jak powszechnie stosowane emulgatory w przetwórstwie spożywczym czy podczas rafinacji olejów [63, 67]. Zdolności emulgacyjne hydrofobin mogą być badane i porównywane razem z typowymi emulgatorami spożywczymi, takimi jak kazeinian sodu, przy użyciu emulsji oleju sojowego. Hydrofobiny klasy II wykazują większą aktywność emulgacyjną i dłuższy okres stabilizacji kropli oleju niż białka klasy I [14, 24, 67].

Ze względu na wysoką elastyczność powierzchniową błon formowanych przez hydrofobiny, są one cenione za swoje właściwości, które przyczyniają się do długotrwałego stabilizowania różnych faz w produktach spożywczych. Na przykład białka te potrafią stabilizować rozproszone pęcherzyki powietrza w lodach [2, 61]. Do takich zastosowań w cukiernictwie często wykorzystywane jest bakteryjne białko BslA z *B. subtilis* [69]. Dzięki obecności tego białka ustabilizowane pęcherzyki powietrza pełnią rolę izolatora, co spowalnia proces roztapiania się lodów. Ponadto proces stabilizacji pęcherzyków powietrza ogranicza powstawanie kryształków lodu, co zapewnia gładką konsystencję produktu. Zastosowanie białka Bs1A może pozwolić producentom zmniejszyć zawartość tłuszczów nasyconych, a więc i kaloryczność lodów [31, 69]. Zdolność do formowania pian może być znacznie większa dla białek klasy II niż klasy I. Ta zależność niesie ze sobą potencjalne nowe zastosowania w przemyśle spożywczym. Piany i bańki utworzone dzięki stabilności białka HFBII potrafią utrzymać się przynajmniej przez 4 miesiące. W niektórych przypadkach, przy niewielkim stężeniu (do 0,1% masowego), tak utworzona piana może pozostać stabilna nawet do kilku lat [21].

Zdolność do łatwego pienienia się hydrofobin niesie też negatywne efekty w postaci tendencji do nadmiernego pienienia się, gazowania i w efekcie wybuchania niektórych napojów, na przykład piwa. Głównym czynnikiem powstawania takiego efektu jest białko klasyfikowane do klasy II hydrofobin wytwarzanych przez *Fusarium culmorum*, grzyba będącego patogenem wywołującym infekcje u jęczmienia. Grzyby z rodzajów *Fusarium, Nigrospora* i *Trichoderma* wytwarzają hydrofobiny z dużą wydajnością, a obecność tych grzybów w gazowanych napojach powoduje ich wybuchanie [7, 37, 59, 62].

Amfipatyczne właściwości hydrofobin są również wykorzystywane w wielu technikach izolacji białek. Zdolność do łączenia się docelowego białka z hydrofobinami jest wykorzystywana w izolacji metodą wodnych układów dwufazowych (ATPS, Aqueous Two-Phase Systems) [14, 46]. Najbardziej efektywnie działającymi hydrofobinami wykorzystywanymi w tej metodzie są hydrofobiny klasy II. Białko HFBI jest używane jako marker dla endoglukanazy celulozy I (EGI, Cellulase Endoglucanase I), a przyłączanie się hydrofobiny do tego enzymu i powstawanie kompleksu EGI-HFBI jest najłatwiejszą, najszybszą i najtańszą metodą izolacji EGI [15, 39, 46, 54]. Zdolność przyłączania się hydrofobin do różnych białek może być wykorzystywana do unieruchamiania enzymów i przeciwciał. Unieruchomienie lipazy przez hydrofobiny z *P. ostreatus* prowadzą do wzmożonej aktywności tego enzymu oraz jego większej stabilności termicznej [38, 45, 54]. Unieruchomienie związków smakowych może być stosowane w przemyśle spożywczym do wspomagania dłuższego utrzymywania się aromatów w jedzeniu i napojach [67].

Pokrywanie powierzchni biosensorów i elektrod przez hydrofobiny może przyczynić się do zwiększenia ich hydrofobowości, a co za tym idzie zahamowania ich denaturacji i zachowania długotrwałej aktywności [4, 85]. Hydrofobiny znajdują również zastosowanie w nanotechnologiach. Pokrycie filmem hydrofobinowym węglowych nanorurek wielościennych, (MWNT, Multi-Walled Nanotubes) pozwoliło zwiększyć ich wrażliwość, poszerzyć zakres liniowy, obniżyć granicę wykrywalności, a co za tym idzie przyspieszyć reakcję wykrywania glukozy [74, 75]. Pokrycie powierzchni elektrod hydrofobiną HYDPt1 z *Pleurotus ostreatus* powoduje, że stają się one stabilne w szerszym zakresie pH. Hydrofobinowy film również skutecznie zapobiega utlenianiu się substratów elektrod [39].

Hydrofobiny są też wykorzystywane do zwiększania biokompatybilności implantów medycznych w zminimalizowaniu reakcji ze strony układy immunologicznego [55, 82]. Powszechnie wykorzystywane polimery pokryte warstwą hydrofobin SC3 w procesie powlekania obrotowego wykazują się zmniejszonym współczynnikiem tarcia o ok. 70–80% w porównaniu do polimerów niepowlekanych. Właściwość tę wykorzystuje się do produkcji materiałów medycznych takich jak cewniki [43, 90]. Zdolność do samoorganizowania się warstw hydrofobinowych została wykorzystana w produkcji aplikowanych doustnie nierozpuszczalnych w wodzie leków. Dodatek hydrofobiny SC3 do zawiesiny cyklosporyny A i nifedypiny zwiększył biodostępność tych leków odpowiednio dwu- i sześciokrotnie [22].

Hydrofobiny klasy II są również wykorzystywane do stymulowania wzrostu komórek na podłożach stałych [5]. Białko HFBI umożliwia łatwe przyleganie

Tabela I
Systemy ekspresyjne prokariotyczne i eukariotyczne wykorzystywane w produkcji hydrofobin i ich wydajność

	Organizm	Pochodzenie hydrofobiny	Nazwa białka	Wydajność [mg/l]	Źródło
Układ prokariotyczny	*Escherichia coli*	*Beauveria bassiana*	Hyd2	10	[24]
	Escherichia coli	*Trichoderma reesei*	HFBI	600	[20, 63]
Układ eukariotyczny	*Trichoderma reesei*	*Aspergillus nidulans*	DewA	33	[70]
	Pichia pastoris	*Trichoderma reesei*	HFBI	120	[29]
	Pichia pastoris	*Grifola frondosa*	HFBI	90	[14, 78]
	Pichia pastoris	*Aspergillus fumigatus*	RodA i RodB	200–300	[7]

kolagenu do hydrofobowej powierzchni poli(dimetylosiloksanu) (PDMS, Polydimethylsiloxane) – polimeru wykorzystywanego m.in. do produkcji soczewek kontaktowych. Kompleks HFBI-kolagen umożliwia przyleganie i wzrost ludzkich embrionalnych komórek macierzystych, z których różnicowanie nastawione jest na powstawanie nerki. Natomiast kompleks białka HFBI-surowica krwi wspomaga powstawanie neutralnych komórek macierzystych [28, 43, 91].

Gromadzenie się hydrofobinowych warstw na granicy faz pomiędzy hydrofobowymi i hydrofilowymi cieczami może być wykorzystywane do stabilizowania różnych emulsji. Szczególne zastosowanie znajduje zdolność hydrofobin do stabilizowania emulsji w przypadku produkcji kremów i maści [74].

8. Przemysłowa produkcja hydrofobin

Odkąd możliwe stało się pozyskiwanie hydrofobin w niewielkich ilościach z naturalnych źródeł, wzrosło zainteresowanie produkcją zrekombinowanych białek na znacznie większą skalę [11, 30, 38, 45, 54]. Chociaż hydrofobiny w środowisku naturalnym wytwarzane są przez grzyby strzępkowe to z powodzeniem udaje się je otrzymać wykorzystując do tego inne systemy ekspresyjne, zarówno prokariotyczne jak i eukariotyczne. Stosowane są różne metody otrzymywania hydrofobin jak homologiczna bądź heterologiczna ekspresja genów [7]. W przemysłowej produkcji tych białek często wykorzystuje się syntezę metodą „fed-batch" polegającą na przeprowadzaniu procesu fermentacji w specjalnie do tego zaprojektowanych reaktorach, dzięki którym można precyzyjnie kontrolować stężenie dostarczanych substratów. Pozwala to na zoptymalizowanie procesu wytwarzania na najbardziej wydajnym poziomie [50].

Otrzymane w taki sposób hydrofobiny wykazują właściwości bardzo zbliżone do białek wytwarzanych przez grzyby w środowisku naturalnym, np. hydrofobiny FcHyd5p (klasa II) i FcHyd3p (klasa I) z *F. culmorum* produkowane w systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris* (drożdże metylotrofowe) wykazują podobne właściwości jak białka produkowane naturalnie przez tego grzyba [14, 63]. Niekiedy występują też problemy z pozyskiwaniem hydrofobin. Przykładem jest homologiczna nadprodukcja białka SC3 u *S. commune*, która jest naturalnie hamowana przez wyciszanie genu. W przypadku wprowadzenia do komórek *S. commune* więcej niż jednej kopii genu kodującego białko SC3 dochodzi do wyciszania genu poprzez metylację kodującego DNA, co doprowadza do zahamowania wytwarzania białka SC3 [36]. Tabela I przedstawia przykładowe wykorzystanie systemów ekspresyjnych prokariotycznych i eukariotycznych w produkcji hydrofobin oraz wydajność, jaką można w ten sposób osiągnąć.

Otrzymywanie funkcjonalnych hydrofobin odbywa się najwydajniej z wykorzystaniem prokariotyczngo systemu ekspresyjnego, jeżeli w wektorze ekspresyjnym umieści się gen kodujący hydrofobinę z *T. reesei.* Przedstawicielem grupy drożdży metylotrofowych są grzyby *P. pastoris*, zdolne do wykorzystywania metanolu jako jedynego źródła węgla. Są one popularną platformą do ekspresji białek heterologicznych łączącą wysoką efektywność produkcji protein z łatwością operowania tym systemem ekspresji [8, 16]. Układ eukariotyczny jest mniej wydajny, jednak w przypadku *P. pastoris* transformowanej genem z *A. fumigatus* wydajność jest tylko dwukrotnie mniejsza. Ze względu na łatwość hodowli i szybki wzrost, *T. reesei* może być również skutecznie wykorzystywana jako nośnik innej hydrofobiny pochodzącej z *A. fumigatus*, aczkolwiek uzyskana wydajność jest najniższa z porównywanych.

9. Podsumowanie

Hydrofobiny stanowią rodzinę niewielkich białek wytwarzanych głównie przez grzyby strzępkowe. Chociaż coraz częściej izolowane są białka o podobnych właściwościach do hydrofobin z organizmów prokariotycznych. Cechą charakterystyczną sekwencji aminokwasowych hydrofobin jest obecność licznych reszt cysteinowych. Hydrofobiny biorą udział w cyklu rozwojowym grzybów oraz są ważnym czynnikiem pozwalającym

przetrwać warunki stresowe. Białka te posiadają właściwości hydrofobowe, zdolność do spontanicznego formowania się w stabilny film białkowy oraz zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego.

Unikatowe właściwości hydrofobin sprawiają, że cieszą się one coraz większym zainteresowaniem pod kątem ich potencjalnego zastosowania w przemyśle. Opracowywane są nowe sposoby ich wykorzystania w różnych gałęziach gospodarki. Szerokie zastosowanie odnajdują w branży spożywczej, gdzie mogą z powodzeniem zastępować powszechnie wykorzystywane m.in. stabilizatory i emulgatory. Poza sektorem spożywczym często hydrofobiny wykorzystywane są w przemyśle farmaceutycznym, ale także w metodach biologii molekularnej.

Hydrofobiny z naturalnych źródeł otrzymywane są w niewielkich ilościach, jednak z powodzeniem można je pozyskiwać wykorzystując do tego celu inne systemy ekspresyjne. Prowadzi się coraz to nowe badania nad hydrofobinami i rozwojem metod ich otrzymywania. Wydaje się obiecującym rozszerzanie badań odnośnie prokariotycznych białek homologicznych do hydrofobin i ich potencjalnego zastosowania.

Podziękowania

Praca sfinansowana z działalności statutowej UMK.

Piśmiennictwo

1. Arnaouteli S., MacPhee C.E., Stanley-Wall N.R.: Just in case it rains: building a hydrophobic biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Curr. Opin. Microbiol.* **34**, 7–12 (2016)
2. Asghari A.K., Norton I., Mills T., Sadd P., Spyropoulos F.: Interfacial and foaming characterisation of mixed protein-starch particle systems for food-foam applications. *Food Hydrocoll.* **53**, 311–319 (2016)
3. Askolin S., Linder M., Scholtmeijer K., Tenkanen M., Penttilä M., de Vocht M.L., Wösten H.A.B.: Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules*, **7**, 1295–1301 (2006)
4. Bilewicz R., Witomski J., Van der Heyden A., Tagu D., Palin B., Rogalska E.: Modification of electrodes with self-assembled hydrophobin layers. *J. Phys. Chem. B.* **105**, 9772–9777 (2001)
5. Brandani G.B., Schor M., Morris R., Stanley-Wall N., MacPhee C.E., Marenduzzo D., Zachariae U.: The bacterial hydrophobin BslA is a switchable ellipsoidal janus nanocolloid. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*, **31**, 11558–11563 (2015)
6. Bromley K.M., Morris R.J., Hobley L., Brandani G., Gillespie R.M.C., McCluskey M., Zachariae U., Marenduzzo D., Stanley-Wall N.R., MacPhee C.E.: Interfacial self-assembly of a bacterial hydrophobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112,** 5419–5424 (2015)
7. Bruns S., Kniemeyer O., Hasenberg M., Aimanianda V., Nietzsche S., Thywissen A., Jeron A., Latgé J.-P., Brakhage A.A., Gunzer M.: Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus in vitro* and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* **6**, e1000873 (2010)
8. Camattari A., Goh A., Yip L.Y., Tan A.H.M., Ng S.W., Tran A., Liu G., Liachko I., Dunham M.J., Rancati G.: Characterization of a panARS-based episomal vector in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for recombinant protein production and synthetic biology applications. *Microb. Cell Fact*. **15**, 139 (2016)
9. Chaplin M.F., Kennedy J.F. (w) Carbohydrate Analysis: A Practical Approach. Red.: M.F. Chaplin, J.F. Kennedy, IRL Press, Oxford (1994), s. 1–324.
10. Cicatiello P., Dardano P., Pirozzi M., Gravagnuolo A.M., De Stefano L., Giardina P.: Self-assembly of two hydrophobins from marine fungi affected by interaction with surfaces. *Biotechnol. Bioeng*. **114**, 2173–2186 (2017)
11. Collén A., Persson J., Linder M., Nakari-Setälä T., Penttilä M., Tjerneld F., Sivars U.: A novel two-step extraction method with detergent/polymer systems for primary recovery of the fusion protein endoglucanase I-hydrophobin I. *Acta Biochim. Biophys. – Gen. Subj*. **1569**, 139–150 (2002)
12. Cooper A., Kennedy M.W.: Biofoams and natural protein surfactants. *Biophys. Chem*. **151**, 96–104 (2010)
13. Cox A., Aldred D.L., Russell A.B.: Exceptional stability of food foams using class II hydrophobin HFBII. *Food Hydrocoll.* **23**, 366–376 (2009)
14. Cox P. W., P. Hooley.: Hydrophobins: New prospects for biotechnology. *Fungal Biol. Rev.* **23,** 40–47 (2009)
15. Dagenais T.R.T., Giles S.S., Aimanianda V., Latgé J.-P., Hull C.M., Keller N.P.: *Aspergillus fumigatus* LaeA-mediated phagocytosis is associated with a decreased hydrophobin layer. *Infect. Immun.* **78**, 823–829 (2010)
16. Daly R., Hearn M.T.: Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* **18,** 119–138 (2005)
17. Danov K.D., Kralchevsky P.A., Radulova G.M., Basheva E.S., Stoyanov S.D., Pelan E.G.: Shear rheology of mixed protein adsorption layers vs their structure studied by surface force measurements. *Adv. Colloid Interface Sci*. **222**, 148–161 (2015)
18. de Vocht M.L. de Reviakine I., Wösten H.A.B., Brisson A., Wessels J.G.H., Robillard G.T.: Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *J. Biol. Chem.* **275**, 28428–28432 (2000)
19. de Vocht M.L., Reviakine I., Ulrich W.-P., Bergsma-Schutter W., Wösten H.A.B., Vogel H., Brisson A., Wessels J.G.H., Robillard G.T.: Self-assembly of the hydrophobin SC3 proceeds via two structural intermediates. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **11**, 1199–1205 (2002)
20. de Vries O.M.H., Fekkes M.P., Wösten H.A.B., Wessels J.G.H.: Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* **159**, 330–335 (1993)
21. Dimitrova L.M., Boneva M.P., Danov K.D., Kralchevsky P.A., Basheva E.S., Marinova K.G., Petkov J.T., Stoyanov S.D.: Limited coalescence and Ostwald ripening in emulsions stabilized by hydrophobin HFBII and milk proteins. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp*. **509**, 521–538 (2016)
22. Ebbole D.J.: Hydrophobins and fungal infection of plants and animals. *Trends Microbiol.* **5**, 405–408 (1997)
23. Gandier J.-A., Master E.R.: *Pichia pastoris* is a suitable host for the heterologous expression of predicted class I and class II hydrophobins for discovery, study, and application in biotechnology. *Microorganisms*, **6**, 3–23 (2018)
24. Gravagnuolo A.M., Morales-Narváez E., Matos C.R.S., Longobardi S., Giardina P., Merkoçi A.: On-the-spot immobilization of quantum dots, graphene oxide, and proteins via hydrophobins. *Adv. Funct. Mater*. **25**, 6084–6092 (2015)
25. Grove S.N., Bracher C.E., Morre D.J.: An ultrastructural basis for hyphal tip growth in *Pythium ultimum*. *Am. J. Bot.* **57**, 245–255 (1970)

26. Haas Jimoh Akanbi M., Post E., Meter-Arkema A., Rink R., Robillard G.T., Wang X., Wösten H.A.B., Scholtmeijer K.: Use of hydrophobins in formulation of water insoluble drugs for oral administration. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **75**, 526–531 (2010)
27. Hobleya L., Ostrowski A., Francesco R.V., Keith B. M., Portera M., Prescottd A.R., MacPheeb C.E., van Aaltena D.M.F, Stanley-Walla N.R.: BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 13600–13605 (2013)
28. Hou S., Yang K., Qin M., Feng X.-Z., Guan L., Yang Y., Wang C.: Patterning of cells on functionalized poly(dimethylsiloxane) surface prepared by hydrophobin and collagen modification. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 918–922 (2008)
29. Houmadi S., Ciuchi F., De Santo M.P., De Stefano L., Rea I., Giardina P., Armenante A., Lacaze E., Giocondo M.: Langmuir--blodgett film of hydrophobin protein from *Pleurotus ostreatus* at the air-water interface. *Langmuir*, **24**, 12953–12957 (2008)
30. Hungund B., Habib, C., Hiregoudar V., Umloti S., Wandkar S., Tennalli G.: Production and characterization of hydrophobins from fungal source. (w) Biotechnology and Biochemical Engineering. Select Proceedings of ICACE, red. B.D. Prasanna, N.G. Sathyanarayana, V.V. Praven, Springer SBM, Singapore, 2016, s. 48–53
31. Kaufman G., Liu W., Williams D.M., Choo Y., Gopinadhan M., Samudrala N., Sarfati R., Yan E.C.Y., Regan L., Osuji C.O.: Flat drops, elastic sheets, and microcapsules by interfacial assembly of a bacterial biofilm protein, BslA. *Langmuir*, **33**, 13590–13597 (2017)
32. Kerr S.C., Fischer G.J., Sinha M., McCabe O., Palmer J.M., Choera T., Lim F.Y., Wimmerova M., Carrington S.D., Yuan S., Lowell C.A., Oscarson S., Keller N.P., Fahy J.V.: FleA expression in *Aspergillus fumigatus* is recognized by fucosylated structures on mucins and macrophages to prevent lung infection. *PLoS Pathog.* **12**, 1005555 (2016)
33. Kershaw M.J., Wakley G., Talbot N.J.: Complementation of the mpg1 mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *EMBO J.* **17**, 3838–3849 (1998)
34. Khalesi M., Gebruers K., Derdelinckx G.: Recent advances in fungal hydrophobin towards using in industry. *Protein J.* **34**, 243–255 (2015)
35. Kisko K.: Characterization of hydrophobin proteins at interfaces and in solutions using X-rays. Academic Dissertation. Acad. Diss. University of Helsinki, Faculty of Science, Department of Physics. (2008)
36. Kottmeier K., Günther T.J., Weber J., Kurtz S., Ostermann K., Rödel G., Bley T.: Constitutive expression of hydrophobin HFB1 from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its pre-purification by foam separation during cultivation. *Eng. Life Sci.* **12**, 162–170 (2012)
37. Kubicek C.P., Baker S., Gamauf C., Kenerley C.M., Druzhinina I.S.: Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the *Ascomycete Trichoderma*/*Hypocrea*. *BMC Evol. Biol.* **8**, 4–20 (2008)
38. Kulkarni S., Nene S., Joshi K.: Production of hydrophobins from fungi. *Process Biochem.* **61**, 1–11 (2017)
39. Kupski L., Pagnussatt F.A., Buffon J.G., Furlong E.B.: Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: production, characterization, and thermal stability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172**, 458–468 (2014)
40. Kwan A.H., Macindoe I., Vukasin P.V., Morris V.K., Kass I., Gupte R., Mark A.E., Templeton M.D., Mackay J.P., Sunde M.: The Cys3--Cys4 loop of the hydrophobin EAS is not required for rodlet formation and surface activity. *J. Mol. Biol.* **382**, 708–720 (2008).
41. Ley K., Christofferson A., Penna M., Winkler D., Maclaughlin S., Yarovsky I.: Surface-water interface induces conformational changes critical for protein adsorption: implications for monolayer formation of EAS hydrophobin. *Front. Mol. Biosci.* **2**, 1–12 (2015)
42. Li B., Wang X., Li Y., Paananen A., Szilvay G., Qin M., Wang W., Cao Y.: Single-molecule force spectroscopy reveals self-assembly enhanced surface binding of hydrophobins. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* (2018)
43. Li X., Hou S., Feng X., Yu Y., Ma J., Li L.: Patterning of neural stem cells on poly(lactic-co-glycolic acid) film modified by hydrophobin. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **74**, 370–374 (2009)
44. Lienemann M., Grunér M.S., Paananen A., Siika-Aho M., Linder M.B.: Charge-based engineering of hydrophobin HFBI: effect on interfacial assembly and interactions. *Biomacromolecules*, **16**, 1283–1292 (2015)
45. Linder M., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Söderlund H., Penttilä M.: Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **11**, 2257–2266 (2002)
46. Linder M.B., Qiao M., Laumen F., Selber K., Hyytiä T., Nakari--Setälä T., Penttilä M.E.: Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two--phase systems. *Biochem.* **43**, 11873–11882 (2004)
47. Linder M.B., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Penttilä M.E.: Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 877–896 (2005)
48. Linder M.B.: Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **14**, 356–363 (2009)
49. Lo V.C., Ren Q., Pham C.L.L., Morris V.K., Kwan A.H., Sunde M.: Fungal hydrophobin proteins produce self-assembling protein films with diverse structure and chemical stability. *Nanomaterials*, **4**, 827–843 (2014)
50. Michelz Beitel S., Fontes Coelho L., Sass D.C., Contiero J.: Environmentally friendly production of D(–) lactic acid by *Sporolactobacillus nakayamae*: investigation of fermentation parameters and fed-batch strategies. *Int. J. Microbiol.* **2017**, 4851612 (2017)
51. Murray B.S., Dickinson E., Wang Y.: Bubble stability in the presence of oil-in-water emulsion droplets: influence of surface shear versus dilatational rheology. *Food Hydrocoll.* **23**, 1198–1208 (2009)
52. Niu B., Gong Y., Gao X., Xu H., Qiao M., Li W.: The functional role of Cys3-Cys4 loop in hydrophobin HGFI. *Amino Acids*. **46**, 2615–2625 (2014)
53. Niu B., Li B., Wang H., Guo R., Xu H., Qiao M., Li, W.: Inves- tigation of the relationship between the rodlet formation and Cys3-Cys4 loop of the HGFI hydrophobin. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **150**, 344–351 (2017)
54. Niu B., Wang D., Yang Y., Xu H., Qiao M.: Heterologous expression and characterization of the hydrophobin HFBI in *Pichia pastoris* and evaluation of its contribution to the food industry. *Amino Acids*. **43**, 763–771 (2012)
55. Palomo J.M., Peñas M.M., Fernández-Lorente G., Mateo C., Pisabarro A.G., Fernández-Lafuente R., Ramírez L., Guisán J.M.: Solid-phase handling of hydrophobins: immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. *Biomacromolecules*, **4**, 204–210 (2003)
56. Pawłowska B.K., Sobieszczańska B.M.: Amyloidy, białka powszechne wśród drobnoustrojów. *Post. Mikrobiol.* **56**, 77–87 (2017)
57. Portaccio M., Gravagnuolo A.M., Longobardi S., Giardina P., Rea I., De Stefano L., Cammarota M., Lepore M.: ATR FT-IR spectroscopy on Vmh2 hydrophobin self-assembled layers for teflon membrane bio-functionalization. *Appl. Surf. Sci.* **351**, 673–680 (2015)

58. Postulkova M., Riveros-Galan D., Cordova-Agiular K., Zitkova K., Verachtert H., Derdelinckx G., Dostalek P., Ruzicka M.C., Branyik T.: Technological possibilities to prevent and suppress primary gushing of beer. *Trends Food Sci. Technol.* **49**, 64–73 (2016)
59. Raffaini G., Milani R., Ganazzoli F., Resnati G., Metrangolo P.: Atomistic simulation of hydrophobin HFBII conformation in aqueous and fluorous media and at the water/vacuum interface. *J. Mol. Graph. Model*. **63**, 8–14 (2016)
60. Richter M.J., Schulz A., Subkowski T., Böker A.: Adsorption and rheological behavior of an amphiphilic protein at oil/water interfaces. *J. Colloid Interface Sci*. **479**, 199–206 (2016)
61. Sallada N.D., Dunn K.J., Berger B.W.: A structural and functional Role for Disulfide Bonds in a Class II Hydrophobin. *Biochemistry*, **57**, 645–653 (2018)
62. Sarlin T., Nakari-Setälä T., Linder M., Penttilä M., Haikara A.: Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *J. Inst. Brew*. **111**, 105–111 (2005)
63. Scholtmeijer K., Janssen M.I., Leeuwen M.B.M. van Kooten T.G., van Hektor H., Wosten H.A.B.: The use of hydrophobins to functionalize surfaces. In: Bio-Medical Materials and Engineering. *IOS Press*. 447–454 (2004)
64. Scholtmeijer K., Wessels J.G., Wösten H.A.: Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **56**, 1–8 (2001)
65. Schor M., Reid J.L., MacPhee C.E., Stanley-Wall N.R.: The diverse structures and functions of surfactant proteins. *Trends Biochem. Sci*. **41**, 610–620 (2016)
66. Schuurs T.A., Schaeffer E., Wessels J.G.: Homology dependent silencing of the *SC3* gene in *Schizophyllum commune*. *G. Genetics*, **147**, 589–596 (1997)
67. Schwarzhans J.-P., Wibberg D., Winkler A., Luttermann T., Kalinowski J., Friehs K.: Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb. Cell Factories*, **15**, 84 (2016)
68. Stanimirova R.D, Gurkov T.D., Kralchevsky P.A., Balashev K.T, Stoyanov S.D., Pelan E.G: Surface pressure and elasticity of hydrophobin HFBII layers on the air–water interface: rheology versus structure detected by AFM imaging. *Langmuir*, **29,** 6053–6067 (2013)
69. Stanley-Walla N.R., MacPheeb C.E.: Connecting the dots between bacterial biofilms and ice cream. *Phys. Biol.* **12**, 063001 (2015)
70. Sunde M., Pham C.L.L., Kwan A.H.: Molecular characteristics and biological functions of surface-active and surfactant proteins. *Annu. Rev. Biochem*. **86**, 585–608 (2017)
71. Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Linder M.B.: Behavior of *Trichoderma reesei* hydrophobins in solution: interactions, dynamics, and multimer formation. *Biochem.* **45**, 8590–8598 (2006)
72. Szilvay G.R., Paananen A., Laurikainen K., Vuorimaa E., Lemmetyinen H., Peltonen J., Linder M.B.: Self-assembled hydrophobin protein films at the air-water interface: structural analysis and molecular engineering. *Biochem*. **46**, 2345–2354 (2007)
73. Tchuenbou-Magaia F.L., Norton I.T., Cox P.W.: Hydrophobins stabilised air-filled emulsions for the food industry. *Food Hydrocoll.* **23**, 1877–1885 (2009)
74. Valo H.K., Laaksonen P.H., Peltonen L.J., Linder M.B., Hirvonen J.T., Laaksonen T.J.: Multifunctional hydrophobin: toward functional coatings for drug nanoparticles. *ACS Nano.* **4**, 1750–1758 (2010)
75. Wang K., Xiao Y., Wang Y., Feng Y., Chen C., Zhang J., Zhang Q., Meng S., Wang Z., Yang H.: Self-assembled hydrophobin for producing water-soluble and membrane permeable fluorescent dye. *Sci. Rep.* **6**, (2016)
76. Wang X., Graveland-Bikker J.F., de Kruif C.G., Robillard G.T.: Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: from soluble state to self-assembly. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **13**, 810–821 (2004)
77. Wang X., Shi F., Wösten H.A.B., Hektor H., Poolman B., Robillard G.T.: The SC3 hydrophobin self-assembles into a membrane with distinct mass transfer properties. *Biophys. J.* **88**, 3434–3443 (2005)
78. Wang Z., Feng S., Huang Y., Li S., Xu H., Zhang X., Bai Y., Qiao M.: Expression and characterization of a *Grifola frondosa* hydrophobin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **72**, 19–25 (2010)
79. Wessels J.G., de Vries O.M., Asgeirsdóttir S.A., Springer J.: The *thn* mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the *Sc3* hydrophobin gene. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2439–2445 (1991)
80. Wessels J.G.H.: Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 413–437 (1994)
81. Whiteford J.R., Spanu P.D.: Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Mol. Plant Pathol*. **3**, 391–400 (2002)
82. Wösten H.A., de Vocht M.L.: Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta*. **1469**, 79–86 (2000)
83. Wösten H.A.: Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol*. **55**, 625–646 (2001)
84. Wösten H.A.B., de Vries O.H.H., Wessels J.G.H.: lnterfacial selfassembly a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell*, **5**, 1567–1574 (1993)
85. Wösten H.A.B., Scholtmeijer K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **99**, 1587–1597 (2015)
86. Wu Y., Li J., Yang H., Shin H.-J.: Fungal and mushroom hydrophobins: A review. *J. Mushroom*, **15**, 1–7 (2017)
87. Wurster S., Thielen V., Weis P., Walther P., Elias J., Waaga-Gasser A.M., Dragan M., Dandekar T. Einsele H., Löffler J., Ullmann A.J.: Mucorales spores induce a proinflammatory cytokine response in human mononuclear phagocytes and harbor no rodlet hydrophobins. *Virulence*, **8**, 1708–1718 (2017)
88. Yamasaki R., Takatsuji Y., Asakawa H., Fukuma T., Haruyama T.: Flattened-top domical water drops formed through self-organization of hydrophobin membranes: a structural and mechanistic study using atomic force Microscopy. *ACS Nano*. **10**, 81–87 (2016)
89. Yu L., Zhang B., Szilvay G.R., Sun R., Jänis J., Wang Z., Feng S., Xu H., Linder M.B., Qiao M.: Protein HGFI from the edible mushroom *Grifola frondosa* is a novel 8 kDa class I hydrophobin that forms rodlets in compressed monolayers. *Microbiol. Read. Engl.* **154**, 1677–1685 (2008)
90. Zhao L., Xu H., Li Y., Song D., Wang X., Qiao M., Gong M.: Novel application of hydrophobin in medical science: a drug carrier for improving serum stability. *Sci. Rep*. **6**, 26461 (2016)
91. Żuchowska A., Kwiatkowski P., Jastrzębska E., Chudy M., Dybko A., Brzozka Z.: Adhesion of MRC-5 and A549 cells on poly(dimethylsiloxane) surface modified by proteins. *Electrophoresis*, **37**, 536–544 (2016)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 385–397
http://www.pm.microbiology.pl

RYZYKO WYSTĄPIENIA CHORÓB PRZENOSZONYCH PRZEZ WEKTORY OWADZIE U ZWIERZĄT W EUROPIE

Katarzyna Krasoń*, Magdalena Larska

Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: Obecnie coraz częściej pojawiają się choroby egzotyczne na obszarach, na których wcześniej nie występowały. Z tego powodu, Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (OIE) i poszczególne kraje wprowadzają przepisy mające na celu zapobieganie tym chorobom oraz ich zwalczanie. Globalizacja i intensyfikacja handlu zwierzętami i produktami spożywczymi pochodzenia zwierzęcego przyczynia się do przenoszenia zakaźnych chorób zwierzęcych na całym świecie. Globalne ocieplenie i ingerencja człowieka w naturę wpływają na występowanie chorób. Wzrost temperatury tworzy odpowiednie warunki do wzrostu i rozprzestrzeniania się wektorów, takich jak komary. Zmiana klimatu może stać się poważnym zagrożeniem przyczyniając się do rozprzestrzeniania się chorób zakaźnych w przyszłości.

1. Wstęp. 2. Choroby przenoszone przez wektory owadzie w Europie. 2.1. Wektory. 2.2. Udział owadów w transmisji mechanicznej. 2.3. Wektory pierwotne i wtórne. 2.4. Współczynnik transmisji. 2.5. Nowo pojawiające się choroby zakaźne 3. Choroby wirusowe przenoszone przez wektory owadzie. 3.1. Flawiwirusy. 3.2. Buniawirusy. 3.3. Reowirusy. 3.4. Pokswirusy. 3.5. Asfarwirusy. 4. Choroby bakteryjne przenoszone przez wektory owadzie. 5. Choroby pierwotniacze przenoszone przez wektory owadzie. 6. Choroby wywoływane przez nicienie przenoszone przez wektory owadzie. 7. Endosymbionty. 8. Podsumowanie

THE RISK OF DISEASES TRANSMITTED BY INSECT VECTORS IN ANIMALS IN EUROPE

Abstract: Currently, the emergence of exotic diseases in areas where they have not previously occurred is reported more frequently. For this reason, the World Organization for Animal Health (OIE) and individual countries are introducing regulations aimed at preventing and combating these diseases. Globalization and intensification of the trade of animals and food products of animal origin contributes to the transmission of infectious animal diseases throughout the world. Global warming and human interference in nature affect the occurrence of diseases. The increase in temperature creates the right conditions for the growth and spread of vectors such as mosquitoes. Climate change may contribute to the spread of infectious diseases in the future.

1. Introduction. 2. Diseases transmitted by insect vectors in Europe. 2.1. Vectors. 2.2. Participation of insects in mechanical transmission. 2.3. Primary and secondary vectors. 2.4. Transmission factor. 2.5. Emerging infectious diseases. 3. Viral diseases transmitted by insect vectors. 3.1. Flaviviruses. 3.2. Buniaviruses. 3.3. Reoviruses. 3.4. Poxviruses. 3.5. Asfarviruses. 4. Bacterial diseases transmitted by insect vectors. 5. Protozoan diseases transmitted by insect vectors. 6. Nematode diseases transmitted by insect vectors. 7. Endosymbionts. 8. Summary

Słowa kluczowe: Choroby przenoszone przez stawonogi, nowe zagrażające choroby, owady, wektory
Key words: Arthropod-borne diseases, emerging infectious diseases, insects, vectors

1. Wstęp

Obecnie, zaczęto odnotowywać występowanie chorób egzotycznych na terenach gdzie wcześniej nie występowały. Z tych względów Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (OIE) i poszczególne państwa wprowadziły przepisy, których celem jest profilaktyka i zwalczanie tych chorób. Rozwój handlu zwierzętami i produktami spożywczymi pochodzenia zwierzęcego przyczynił się do zglobalizowanej transmisji chorób zakaźnych zwierząt i ludzi. Występowanie chorób zakaźnych zależy od tzw. triady epizootycznej, czy epidemiologicznej, czyli od trzech czynników: gospodarza, patogenu i środowiska rozprzestrzeniania [22]. W przypadku chorób przenoszonych przez wektory tj. stawonogi, należy wyróżnić czwarty czynnik – wektory. Długotrwałe ocieplenie klimatu ma wpływ na pojawiające się ogniska chorobowe. Odpowiednie warunki są niezbędne dla rozwoju patogenów. Przykładem są ulewne deszcze, które stwarzają miejsce do rozrodu większości owadów. Przedłużające się okresy suszy wpływają na zmniejszenie liczebności populacji nosicieli chorób zakaźnych, natomiast opady deszczu mogą tą liczebność zwiększać. Choroby zakaźne mogą mieć tendencję do cykliczności sezonowej. Patogeny przenoszone przez komary są szczególnie wrażliwe na zmiany warunków klimatycznych. Pojawienie się epidemii jest wynikiem obecności czynników klimatycznych powodujących wzrost liczby komarów, takich jak opady czy wysokie temperatury, jak również środowiska sprzyjającego rozmnażaniu się komarów np. tereny bagienne. Komary giną przy nadmiernie wysokiej temperaturze, natomiast przy niższej, ale nadal w ciepłych warunkach termicznych zwiększają zdolności reprodukcyjne i aktywność do żerowania [22].

* Autor korespondencyjny: Katarzyna Krasoń, Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; tel. 81 889 33 99; e-mail: katarzyna.krason@piwet.pulawy.pl

2. Choroby przenoszone przez wektory owadzie w Europie

Komary są najlepiej poznanymi wektorami wirusów, bakterii, grzybów, nicieni oraz pierwotniaków. Obecnie na świecie opisano 3500 gatunków komarów (*Culicidae*), które są podzielone na trzy podrodziny *Anophelinae*, *Culicinae* i *Toxorhynchinae*. W Europie jest 101 gatunków komarów reprezentowanych w ośmiu rodzajach. W Polsce występuje 47 gatunków komarów zaklasyfikowanych do sześciu rodzajów *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Anopheles*, *Ochlerotatus* i *Coquillettidia* [1]. Wiele arbowirusów jest przenoszonych przez owady np. przedstawiciele rodzin *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* i *Bunyaviridae*. U większości żywicielami rezerwuarowymi i wzmacniającymi są ptaki wolno żyjące, szczury i zwierzęta domowe. Wszystkie te zwierzęta stwarzają ryzyko infekcji i są źródłem zakażenia dla komarów. Arbowirusy mające znaczenie dla zdrowia publicznego i weterynarii są przenoszone przez muchówki (z gatunku *Culicoides*) lub mechanicznie przez pchły, komary lub meszki z rodziny *Simuliidae* [6, 7, 67, 72].

2.1. Wektory

Wektorami mogą być stawonogi, a w większości owady przenoszące biologiczne czynniki chorobotwórcze ze źródła zakażenia bezpośrednio na osobnika lub pośrednio zakażając żywność, przedmioty, z którymi mają kontakt. Najczęściej są to krwiopijne owady, które razem z krwią pobierają patogen i zmieniając kolejnego żywiciela wprowadzają go do jego organizmu. Do najlepiej poznanych wektorów należą komary, muchy (piaskowe, czy tse-tse), meszki, krwiopijne muchówki (kuczmany), niektóre pluskwiaki, pchły, wszy, kleszcze, a nawet ślimaki. Należy podkreślić udział kleszczy, które są istotnym wektorem wielu chorób zwierzęcych, lecz ze względu na to, że artykuł traktuje o owadach, kleszcze zostały pominięte. Wektor jest krytycznym ogniwem w przenoszeniu choroby. Posiada pasożytniczy styl życia, dostosowany do sposobu przenoszenia patogenu oraz do narażenia zwierzęcia na zarażenie. Stawonogi przenoszą ponad 500 arbowirusów (wirusy których wektorem są stawonogi – ARthropod-BOrne virus). Arbowirusy posiadają zdolność namnażania się w organizmie wektora oraz we krwi zaatakowanego kręgowca. Dzięki temu, ilość wirusa w wektorze jest zawsze wystarczająca do wywołania infekcji u zwierzęcia. Wśród wirusów zwierzęcych wektorami są owady, głównie posiadające kłująco-ssący narząd gębowy. Najliczniejszymi wektorami arbowirusów są komary. Przenoszenie choroby ma miejsce podczas ssania krwi przez zarażonego owada oraz, gdy kręgowiec połknie zarażony organizm nosiciela lub rana zostanie zanieczyszczona kałem wektora zawierającego materiał zaraźliwy [6, 37, 50]. W interakcji wirus-wektor główną rolę może odgrywać białko kapsydu wirusa [11].

Tabela I
Choroby wirusowe przenoszone przez wektory

Choroby wirusowe przenoszone przez wektory	
Wektory biologiczne	Wektory mechaniczne
Afrykański pomór koni Choroba guzowatej skóry bydła Choroba niebieskiego języka Gorączka doliny Rift Gorączka Zachodniego Nilu Krwotoczna choroba zwierzyny płowej Wirus Schmallenberg Wirus Zika	Afrykański pomór świń BVDV* Choroba guzowatej skóry bydła Myksomatoza Niedokrwistość zakaźna koni Ospa ptasia

* Podejrzewa się, że owady mogą uczestniczyć w mechanicznej transmisji BVDV.

2.2. Udział owadów w transmisji mechanicznej

Owady które są wektorami biologicznymi, są zarażone przez dłuższy czas. Taki owad jest niezbędny do transmisji patogenu. Jednakże owady mogą także przenosić choroby mechanicznie. Wektor jest wtedy czasowo nosicielem patogenów, przenosząc je na zanieczyszczonych częściach aparatu gębowego lub odnóżach. Owad wtedy nie jest niezbędny do cyklu życiowego patogenu [9, 37] (Tab. I).

2.3. Wektory pierwotne i wtórne

Wektory i patogeny w czasie rozwoju ewolucyjnego wytworzyły bliskie związki. Wektorami pierwotnymi są stawonogi ograniczone do jednego lub do kilku blisko spokrewnionych gatunków, które mogą przenosić określony patogen. Wtórne wektory posiadają zdolność do przenoszenia tylko niektórych szczepów z danego gatunku patogenu. Wpływają na ich zdolność do przetrwania w środowisku i przenoszenie na nowe tereny. Jeden wektor może być także nosicielem wielu różnych patogenów. Kontakt z wektorami będącymi nosicielami wielu patogenów stwarza ryzyko infekcji mieszanych które zaostrzają objawy kliniczne u zarażonego zwierzęcia [6, 96].

2.4. Współczynnik transmisji

Współczynnik transmisji dla danego patogenu jest to liczba zarażeń, które ma miejsce w określonej jednostce czasu [6]. Na współczynnik transmisji mają wpływ żywiciele rezerwuarowi, charakterystyka wektora i czynnik patogenny. Dodatkowo długość życia oraz różnorodność gatunków, długość i zdolność do przetrwania infekcji w żywicielu rezerwuarowym oraz oddziaływanie między wektorami, rezerwuarami

i patogenem, mają wpływ na współczynnik transmisji patogenu. Organizm kręgowca aby został efektywnym żywicielem rezerwuarowym powinien wykazywać wrażliwość na zakażenie i być w stanie zarażać kompetentne, zdolne do przekazywania choroby wektory. Musi także dzielić wspólną niszę środowiska z wektorami, co umożliwi im stały i bliski kontakt. Żywiciel rezerwuarowy i wektor muszą mieć podobne zwyczaje oraz funkcjonować wspólnie w tym samym czasie dnia i pory roku, aby narażenie na zachorowanie i przekazanie choroby było możliwe [6].

2.5. Nowo pojawiające się choroby zakaźne

Nowo pojawiające się choroby zakaźne (emerging infectious diseases) to infekcje bakteryjne i wirusowe oraz inwazje pasożytnicze, których częstość występowania wzrosła w ciągu ostatnich lat i może wzrosnąć w najbliższej przyszłości na danym obszarze. Choroby nowo pojawiające są wywołane przez nowo powstające lub nowo odkryte patogeny, albo patogeny o nowym spektrum lekooporności, które pojawiły się na skutek ewolucji już istniejącego i znanego czynnika chorobotwórczego, albo też rozprzestrzenienia się znanego patogenu na nowe tereny (re-emergence), czy do innego gatunku zwierząt. Za istotne uważa się ponowne pojawienie się wcześniej identyfikowanych na danym obszarze chorób, które pojawiły się tam po okresie zmniejszenia częstości ich występowania lub całkowitej eradykacji z danego obszaru. Na rozprzestrzenianie się i obecność nowo pojawiających się chorób ma wpływ wiele czynników. Zalicza się do nich: procesy adaptacyjne mikroorganizmów zależne od zmian w ich materiale genetycznym, zmiany klimatyczne, procesy demograficzne, urbanizację, industrializację, zawleczenie wektorów oraz rozwój transportu. Mogą być to także zamierzone działania człowieka, takie jak użycie patogenów w celach bioterrorystycznych. Dodatkową przyczyną są czynniki socjoekonomiczne, które mogą mieć wpływ na działania w zakresie ochrony zdrowia publicznego, a co zatem może skutkować zmianami obszaru występowania wektorów i patogenów [24, 41, 47, 68].

3. Choroby wirusowe przenoszone przez wektory owadzie

3.1. Flawiwirusy

Gorączka Zachodniego Nilu

Gorączka Zachodniego Nilu (West Nile fever) jest ostrą chorobą wirusową przenoszoną przez komary w większości z rodziny *Culex*. Atakuje ptaki wędrowne, konie, gady oraz inne ssaki, a także człowieka [4, 15]. Choroba występuje w strefach wilgotnych, gdzie żyją głównie dzikie ptaki migrujące, tworzące naturalne ognisko infekcji. Odgrywają one ważną rolę w rozprzestrzenianiu się patogenu. Wirus WNV (rodzina *Flaviviridae*, wirusy RNA, (+) ssRNA) do przetrwania w środowisku potrzebuje wektora – komara oraz żywiciela rezerwuarowego – ptaka. Początkowo choroba przebiega z gorączką, która w zaawansowanych przypadkach kończy się zapaleniem mózgu i śmiercią. Wirus pierwotnie występujący w Afryce został przeniesiony do Ameryki Północnej w roku 1999 i od tego czasu zaadoptował się na terenie Stanów Zjednoczonych. Za roznoszenie choroby jest odpowiedzialny komar egipski (Aedes aegypti). Przenosi on zarówno flawiwirusy takie jak gorączka Zachodniego Nilu i Denga, jak i zarodźca malarycznego [5, 36, 78]. Globalne ocieplenie spowodowało dla tego komara doskonałe warunki do ekspansji w Europie. Komary przybywają do Europy różnymi drogami. Niedaleko Groningen w Holandii została odkryta ich kolonia w przywiezionym do przerobu transporcie opon, który odbył się prawdopodobnie nielegalnie z Egiptu [62]. Obecnie komary egipskie znajdują się w większości krajów Europy i tworzą kolonie z wyjątkiem Europy Północnej i południowych wybrzeży Bałtyku oraz Morza Północnego. Mają dobre warunki do życia i nabywają kompetencji do przenoszenia nowych patogenów. Europę prawdopodobnie czeka los Kanady i USA. W 1999 roku gorączka Zachodniego Nilu i Denga oraz komary egipskie zadomowiły się tam na dobre. Wirusy wraz z komarami obecnie dotarły do środkowych prowincji Kanady [8, 65, 66]. Istnieje zagrożenie, że gorączka Zachodniego Nilu dotrze do Polski. Chorobę zidentyfikowano już na Białorusi, ale nie wiadomo, jakie może być źródło tego zakażenia. Przed zbyt pochopnymi alarmami ostrzeżeniem jest wypadek z londyńskiego lotniska Heathrow. W jego okolicach pojawił się przypadek malarii, spowodowany przez komary, którym udało się przeżyć lot z Afryki. Choroba jednak wygasła , ponieważ nosiciele nie utworzyli siedlisk [62].

BVDV

Wirus biegunki bydła jest patogenem szeroko rozpowszechnionym w pogłowiu bydła. Poza Islandią został stwierdzany we wszystkich krajach świata, gdzie występują przeżuwacze. Odsetek serologicznie dodatnich zwierząt w różnych krajach waha się od 19 do 89%. BVDV jest pestiwirusem z rodziny *Flaviviridae*. Głównym źródłem infekcji stada są zwierzęta trwale zakażone P.I. (Persistent Infection), które przez całe swoje życie wydalają ogromne ilości wirusa do środowiska. Rezerwuarami BVDV są również inne przeżuwacze, w tym wolno żyjące. Podejrzewa się, że owady mogą uczestniczyć w mechanicznej transmisji BVDV. Wirus wykryto u much *Haematobia irritans,* ale nie wydają

się być ważnym wektorem do transmisji BVDV [10]. Ponadto BVDV wyizolowano od niekrwiopijnych much żerujących na wydzielinach z worka spojówkowego cieląt P.I. [38]. Wirusowa biegunka bydła i choroba błon śluzowych jest główną przyczyną strat ekonomicznych w hodowli bydła.

Wirus Zika

Wirus Zika (ZIKV) należy do wirusów RNA z rodziny Flaviviridae. Komary *Aedes aegypti* i *Aedes albopictus* są w dużej mierze odpowiedzialne za transmisję Zika na człowieka. Wirus jest przenoszony przez komara tygrysiego (*A. albopticus*) podczas ssania krwi, który jest także wektorem wirusa Denga. Naturalnym środowiskiem *A. albopticus* są rejony Azji, jednak gatunek ten coraz częściej występuje w Europie. Obydwa typy komarów mają również szansę stać się stałymi gatunkami europejskimi, były one obecne w Europie już na początku XX wieku. *Aedes aegypti* ostatnio obserwowano w Gruzji i Rosji, natomiast komary *Aedes albopictus* występują w większości południowoeuropejskich krajów, sięgając aż do Holandii. Światowa Organizacja Zdrowia określiła wirus Zika jako zagrożenie epidemiczne o potencjalnie światowym zasięgu. W organizmie komara przemieszczającego się z wiatrem wirus może przebyć nawet kilkaset kilometrów nad oceanem, chociaż w jego transmisji rolę odgrywać mogą też pacjenci z wiremią [37]. Wirus Zika wywołuje łagodne objawy grypopodobne. Coraz więcej obserwacji wskazuje jednak na związek pomiędzy zakażeniem ciężarnej matki wirusem Zika a małogłowiem (microcefalia) u dzieci. W maju 2015 roku wystąpiła epidemia w Brazylii, chorowało wtedy aż 1,5 mln ludzi. Następnie epidemia rozprzestrzeniła się na pozostałe kraje prawdopodobnie poprzez kibiców piłki nożnej [32]. W Brazylii rodzi się obecnie 10–20-krotnie więcej dzieci z małogłowiem w porównaniu z latami poprzednimi [77]. W 2014 roku wirus przedostał się wraz z zakażonymi turystami w trakcie piłkarskiego mundialu lub za pośrednictwem uczestników Światowego Dnia Młodzieży, obchodzonym w 2013 roku w Rio de Janeiro. Problem patogenności wirusa Zika dla zwierząt towarzyszących i gospodarskich jest ciągle otwarty i nie ma podstaw do wykluczenia takiej możliwości [20, 32, 81]. Istnieją jednak poważne wątpliwości, czy komary mogą przenosić wirusa Zika na małpy w naturze. Nie są znane żadne rezerwuary wirusa Zika poza naczelnymi, choć w jednym z badań wirus stwierdzono u gryzoni [20, 40]. Przeciwciała reagujące z antygenami ZIKV zostały znalezione również u innych zwierząt, wśród których wymieniane są wół domowy, hipopotamowate, owca, koza, lew afrykański, gnu, impala zwyczajna, bawolec krowi, zebry, słoniowate, a także właśnie gryzonie [39]. Obecność populacji komarów *Aedes* w Europie, nadchodzący szczytowy przepływ osób podróżujących transportem lotniczym oraz cieplejszy klimat są czynnikami czyniącymi z południowej Europy podatny grunt dla Zika.

3.2. Buniawirusy

Rodzina *Bunyaviridae* – obejmuje sześć rodzajów: Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, Phlebovirus, Orthobunyavirus i Tospovirus.

Wirusy RNA – jednoniciowy RNA o ujemnej polarności (–)ssRNA)

Gorączka doliny Rift

Gorączka Doliny Rift (Rift Valley Fever, RVF) jest to jedna z najgroźniejszych chorób odzwierzęcych. Dotychczas była uważana za „chorobę egzotyczną", ponieważ jej występowanie ograniczało się do Półwyspu Arabskiego i Afryki. W wyniku zdiagnozowania po raz pierwszy zachorowań na gorączkę Doliny Rift na terenie Europy, podjęte zostały działania przez Światową Organizację Zdrowia (WHO), Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE) i rządy wielu państw, których celem jest zapobieganie nowym zachorowaniom, a w przypadku ich wystąpienia, szybka likwidacja ognisk. Choroba znajduje się w wykazie chorób zakaźnych zwierząt podlegających obowiązkowi zwalczania na terenie Polski wg ustawy z dnia 11 marca 2004 r. „O ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt" (Dz. U. z dnia 20 kwietnia 2004 r.) [95]. Chorobę wywołuje Phlebovirus z rodziny *Bunyaviridae*. Wirus występuje endemicznie w Afryce i utrzymuje się w środowisku dzięki obecności komarów oraz żywiciela rezerwuarowego, który należy do przeżuwaczy. Komary z rodzajów: *Culex*, *Mansonia*, *Eretmapodites Aedes* i *Anopheles* są wektorami wirusa. W przeszłości zdarzały się epidemie na wielką skalę dotykające ludzi i bydło. Choroba ma charakter sezonowy. Podczas pory deszczowej w Afryce oraz w sąsiedztwie dużych zbiorników wodnych przypada jej największe nasilenie. W 1913 r. w Kenii zdiagnozowano pierwsze przypadki choroby powodującej masowe padanie owiec, natomiast w 1931 r. opisano wirusa będącego przyczyną epizootii owiec w Dolinie Rift (Kenia). Wszystkie znane epidemie w Kenii w latach 1950–1998 wystąpiły po okresach nadzwyczajnie wysokich opadów deszczu, co jest związane ze zjawiskiem El Niño [2, 33]. W 1996 r. w Rumunii i Monako wystąpiły pierwsze przypadki gorączki Doliny Rift w Europie. Następnie w 1998 r. choroba wystąpiła we Włoszech, w 1999 r. w Rosji oraz w 2000 r. we Francji. Epidemie gorączki Doliny Rift pojawiają się cyklicznie co 5–15 lat na terenach ich endemicznego występowania. Ma to związek z pojawieniem się popu-

lacji zwierząt wrażliwych na zakażenie i zejściem populacji, która uzyskała odporność w poprzedniej epidemii choroby. Na terenach depresyjnych znaczenie mogą mieć także „drzemiące jaja komarów". Samice komarów zakażają wirusem jaja i z nich wylęga się nowe zakażone pokolenie komarów. Profilaktyka terenów endemicznych występowania choroby obejmuje likwidację wektorów oraz szczepienie zwierząt. Zakażenie aerozolowe ma miejsce podczas rozbioru i sprzedaży tusz chorego bydła i owiec. Dlatego nie zaleca się wybijania chorych zwierząt. W Polsce, która jest wolna od gorączki Doliny Rift szczegółowe postępowanie zawiera Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 22 stycznia 2003 r. Dz. U. nr 18, poz. 163, 2003 [82]. Droga transmisji wirusa nie została jeszcze w pełni udowodniona. Zakażony człowiek w okresie wiremii prawdopodobnie może stanowić źródło zakażenia dla komarów i za ich pośrednictwem wirus jest przeniesiony na wrażliwe gatunki zwierząt. Rezerwuarem wirusa są niektóre gatunki gryzoni, a także koty, psy, małpy, króliki i konie. Mogą one zawlec chorobę na teren Europy. Wirus ma zoonotyczny charakter i wywołuje masowe zachorowania, w tym ciężkie postacie kliniczne cechujących się zgonami. Jest to nie tylko groźna zoonoza, ale również „nowo zagrażająca" (new emerging disease) choroba zakaźna wielu gatunków zwierząt [31].

Wirus Schmallenberg

Zakażenia SBV (Schmallenberg Virus) należą do transmisyjnych. Wirus jest przenoszony przez kłująco-ssące muchówki zwane kuczmanami (*Culicoides* spp.). Należy do bunyavirusów, do których zaliczamy wirusy patogenne zarówno dla zwierząt jak i ludzi. Dotąd nie wyjaśniono, czy ten „egzotyczny" wirus został nowo wprowadzony, czy już występował od jakiegoś czasu w populacji przeżuwaczy w Europie. Nad wyjaśnieniem szeregu zagadnień z tym związanych trwają obecnie intensywne badania wirusologiczne i epidemiologiczne. SBV jest przykładem pojawienia się nowego, niebezpiecznego patogenu w nowym rejonie geograficznym. Porównywany jest do wirusa choroby niebieskiego języka (BTV), gdyż w transmisji wirusów uczestniczą te same wektory owadzie oraz wrażliwe na zakażenie są te same gatunki przeżuwaczy. Tempo rozprzestrzeniania się SBV w stosunku do BTV jest szybsze. W ciągu kilku miesięcy, do grudnia 2012 r. obecność SBV potwierdzono poprzez EFSA (Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności) w 17 krajach europejskich, w tym w Polsce. W Polsce SBV po raz pierwszy wyizolowany został z przypadków zakażeń subklinicznych u bydła dorosłego w sierpniu 2012 r. Ogniska zakażeń SBV zidentyfikowano w stadach bydła mięsnego na terenie województwa zachodniopomorskiego i śląskiego; były one prawdopodobnie wynikiem wwiezienia do polskich gospodarstw buhajów z Francji. Wirusowe RNA zidentyfikowano pod koniec sierpnia 2012 r. u kuczmanów odłowionych w pułapkę zlokalizowaną 5 km od miejsca pobytu jednego z tych buhajów. SBV pojawiło się w Polsce niedawno, ale szybko rozprzestrzeniło się na terenie całego kraju. Transmisja wirusa będzie postępowała dzięki obecności wrażliwych gatunków kuczmanów i możliwości przezimowania w nich wirusa [44, 56, 57]. Materiał genetyczny wirusa stwierdzono w gatunkach muchówek *C. obsoletus* i *C. punctatus*, najbardziej licznych w Polsce [55]. Polscy badacze jako pierwsi zasugerowali możliwość transowarialnej transmisji SBV u owadów [55], czego nie udało się dowieść dla BTV. Jedną z ciekawostek dotyczących SBV jest możliwość transmisji na potencjalnie niewrażliwe gatunki zwierząt. We Francji wirus został zidentyfikowany u szczeniąt owczarka belgijskiego, u których zaobserwowano podobne jak u nowonarodzonych przeżuwaczy zakażonych śródmacicznie SBV wady wrodzone ze strony układu nerwowego [84]. Zakażenie SBV jest nową jednostką chorobową, która w Polsce nie podlega w obowiązkowi zgłaszania. Konieczny jest monitoring zakażeń SBV ze strony lekarzy weterynarii, hodowców oraz pracowników ferm, również w zakresie zagrożenia dla zdrowia publicznego. Brak jest metod zapobiegania i zwalczania. Stosowanie insektycydów i repelentów oraz ochrona zwierząt poprzez nie dopuszczanie do kontaktu z owadami są mało skuteczne. Zakażenia tego typu wymagają zwykle immunoprofilaktyki swoistej przed sezonem aktywności wektorów.

3.3. Reowirusy
Rodzina *Reoviridae*

Wirusy, których genom stanowi dwuniciowy RNA (dsRNA)

Choroba niebieskiego języka

Choroba niebieskiego języka (Bluetongue disease, BT) nie jest groźna dla ludzi, jednak dla zwierząt stanowi ogromne zagrożenie. Dotyka przeżuwaczy gospodarskich (głównie bydło, owce i kozy), jak też wolno żyjących (sarny, jelenie, afrykańskie antylopy czy wielbłądy). W Polsce choroba niebieskiego języka jest nazywana także „pryszczycą rzekomą". Do transmisji horyzontalnej konieczny jest wektor, którym są kuczmany. BT to choroba zakaźna lecz niezaraźliwa. Culicoides variipennis jest uważany za głównego wektora BTV i EHD w Ameryce Północnej. W Australii ważniejszą rolę odgrywa *Culicoides brevitarsis*, a *C. imicola* jest istotnym wektorem na Bliskim Wschodzie, w południowej Europie i Afryce. BTV namnaża się w przewodzie pokarmowym owadów skąd po ukłuciu owada zostaje przeniesiony na przeżuwacze. Obserwuje się wyraźną

sezonowość występowania BT, związaną z okresami aktywności kuczmanów. Kuczmany nie są odporne na niskie temperatury dlatego ich zasięg występowania jest uwarunkowany od klimatu. Najszybciej choroba rozprzestrzenia się w strefach o klimacie cieplejszym od naszego. Postępujące ocieplenie klimatu zwiększa zasięg występowania i aktywność roczną kuczmanów, dlatego pojawienie się choroby niebieskiego języka w centralnej i wschodniej Europie na początku XXI w. wiązane jest m.in. ze zmianami klimatycznymi. Choroba niebieskiego języka do niedawna była uważana w Europie za egzotyczną, która występuje jedynie w krajach o ciepłym klimacie. W ostatnich 8–9 latach wyraźnie zmienił się zasięg jej geograficznego występowania, obejmując coraz więcej krajów europejskich. Spowodowane jest to prawdopodobnie globalnym ociepleniem, którego konsekwencją był wzrost przeżywalności kuczmanów w okresie zimy oraz większą możliwością namnażania się wirusa. W wyniku ekspansji głównego wektora wirusa *C. imicola* na północ Europy oraz przenoszeniu wirusa poprzez europejskie gatunki kuczmanów, rozszerzyło się zagrożenie wirusem na znacznie większe obszary geograficzne. Choroba jest ostatnio obserwowana zarówno na południu jak i na północy Europy, w tym w Polsce [30, 51, 60, 63, 74, 83].

Krwotoczna choroba zwierzyny płowej

Krwotoczna choroba zwierzyny płowej (Epizootic Haemorrhagic Disease of deer, EHD) jest chorobą zakaźną podlegającą zwalczaniu na terenie Polski, jednak nie była jeszcze w kraju notowana. Wirus EHD podobnie jak BTV jest orbiwirusem zakaźnym dla przeżuwaczy gospodarskich i wolno żyjących. Wywołuje chorobę u jeleni wirginijskich (*Odocoileus virginianus*), u niektórych gatunków nieudomowionych przeżuwaczy a także u owiec, kóz i bydła. W Ameryce Północnej jest popularną jednostką chorobową występującą wśród jeleni. Bydło i owce wykazują wrażliwość na wirusa EHD, ale choroba u zwierząt domowych ma zwykle charakter subkliniczny. Występowanie choroby niebieskiego języka w wielu krajach Europy, zwraca uwagę na możliwość wystąpienia również krwotocznej choroby zwierzyny płowej. Ponadto te dwie jednostki chorobowe mogą występować w tym samym ognisku choroby oraz atakować jednocześnie to samo zwierzę. EHDV, podobnie jak BTV, jest przykładem wirusa przenoszonego przez wektory biologiczne, jakimi są kuczmany rodzaju *Culicoides*. Wektorem EHDV w Europie, środkowym Wschodzie i Afryce jest *C. imicola*, Ameryce Północnej *C. variipennis*, w Ameryce Centralnej i Południowej *C. insignis* natomiast w Australii *C. brevitarsis*, *C. wadai*, *C. antoni* i *C. fulvus*. Transmisja wirusa jest możliwa tylko przy udziale owadów. Kuczmany zakażają się pijąc krew zwierząt w okresie wiremii [34]. Chorobę cechuje sezonowość, ma to ścisły związek z występowaniem kuczmanów jako wektorów choroby.

Afrykański pomór koni

Wirus wywołujący tę chorobę jest orbiwirusem razem z EHDV i BTV. Wirus AHS (African Horse Sickness) wywołuje niebezpieczną chorobę o wysokiej śmiertelności u koniowatych zamieszkujących sąsiadujące z Saharą terytoria Afryki [3]. Przenoszony jest przez kuczmany z rodzaju *Culicoides* (*C. bolitinos* i *C. imicola*). Ogniska tej choroby notowano także w południowej Europie i na Bliskim Wschodzie. Ostatnia zanotowana od 1987 r. epizootia AHS objęła Maroko, Portugalię i Hiszpanię, wygasając dopiero po czterech latach od wprowadzenia szczepień [93]. Przenoszenie wirusa moze być także mechanicznie przez inne krwiopijne muchówki, szczególnie podczas epidemii, które występują po długich okresach suszy zakończonych deszczami. Psy mogą zostać zainfekowane wirusem AHS ale nie odgrywają żadnej roli w epidemiologii choroby. U zakażonych koni pojawia się gorączka, może powstać znaczny obrzęk okolicy twarzowej oraz mogą rozwinąć się objawy ze strony układu oddechowego. Śmiertelność we wrażliwej populacji koni może sięgać 50–95%. U osłów i mułów choroba ma lżejszy przebieg o niższej śmiertelności, natomiast u zebr rzadko kończy się śmiercią [23, 58, 64, 65].

Niedokrwistość zakaźna koni

Nawracająca choroba wirusowa wywoływana przez wirus z rodziny *Retroviridae* (podrodzina *Lentivirinae*). Przenoszona może być mechanicznie przez owady krwiopijne takie jak, bąki z rodziny *Tabanidae*, ślepaki z rodzaju *Chrysops*, komary i bolimuszki. Zakaźna choroba koni, mułów i osłów, występuje na całym świecie, częściej na terenach zalesionych i bagiennych. Zwierzęta są wrażliwe w każdym wieku, bez względu na płeć i rasę. Naturalnym rezerwuarem są zwierzęta koniowate i zebry. Zakażenie następuje przez uszkodzenie nabłonka lub skóry. Infekcja rozprzestrzenia się za pośrednictwem much ssących krew, zwłaszcza przez bąki między osobnikami żyjącymi w bliskim sąsiedztwie. Te duże, kłujące owady powodują ból w miejscu ukłucia oraz podrażnienie skóry. Konie broniąc się przed pokłuciami, często nie mogą skutecznie pobierać paszy. Pomimo tego muchy szybko powracają kłując tego samego lub innego osobnika, w rezultacie następuje mechaniczna transmisja wirusów. Zakażone osobniki zostają nosicielami wirusa przez całe życie. Stanowią rezerwuar infekcji dla innych zwierząt. Śmiertelność może sięgać do ok. 30%, natomiast u ozdrowieńców utrzymuje się dożywotnie nosicielstwo wirusa. Test immunodyfuzji w żelu agarowym stosuje się do identyfikacji bezobjawowych nosicieli. Zarażone zwierzęta są separowane od pozostałych koni [6].

3.4. Pokswirusy
Rodzina *Poxviridae*

Wirusy, których genom stanowi dwuniciowy DNA (dsDNA)

Choroba guzowatej skóry bydła

Choroba guzowatej skóry bydła (Lumpy Skin Disease, LSD) jest zaliczana w Europie do „chorób egzotycznych. Wywołuje ją wirus z rodziny *Poxviridae*. Wirus jest spokrewniony z wirusem ospy owiec i kóz. Występuje tylko jeden serotyp wirusa. Ułatwia to rozpoznanie serologiczne choroby oraz immunoprofilaktykę swoistą. W Polsce znajduje się w wykazie chorób zakaźnych zwierząt podlegających obowiązkowi zwalczania (ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o „Ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt") [95]. Podlega notyfikacji w krajach Unii Europejskiej wg dyrektywy 82/894. Na chorobę największą wrażliwość wykazuje bydło domowe, zwłaszcza bydło mleczne rasy Guernsey, Ayrshires i Jersey. LSD obecnie występuje w regionie transsaharyjskim Afryki zachodniej oraz w południowej i wschodniej Afryce. W sierpniu 2015 r. obecność wirusa LSD potwierdzono w Grecji. Był to pierwszy przypadek choroby guzowatej skóry zdiagnozowany na terenie Unii Europejskiej [92]. W 2016 r. LSD stwierdzono także w Bułgarii. Były to 3 ogniska choroby zidentyfikowane w ramach programu kontroli LSD w tym kraju [27, 42, 80, 92]. Choroba rzadko szerzy się drogą kontaktu bezpośredniego między zwierzętami. Owady krwiopijne w szczególności komary (*Culex mirificens*, *Aedes natrionus*) i muchy (*Biomyla fasciata*, *Stomoxys calcitrans*) są głównym przenosicielem wirusa z chorych osobników na zdrowe [12]. W nowszych badaniach przeprowadzonych w Izraelu zwrócono uwagę na bolimuszkę jesienną (*Stomoxys calcitrans*). Nie można wykluczyć jej roli jako potencjalnego wektora choroby. Czas pojawiania się choroby (grudzień-kwiecień) jest w Izraelu zbieżny z okresem występowania tego owada. Podobne dane o związku występowania bolimuszki i przypadków LSD przekazywano z Tajlandii. Należy zaznaczyć, że ta szaro-czarna mucha, o charakterystycznych jasnych paskach, przypomina muchę tse-tse. W Polsce należy do gatunków pospolitych. Prawdopodobnie lista wektorów LSD może być szersza. Wirus przedostaje się do organizmu podczas ssania krwi przez zakażone owady krwiopijne. W miejscu ukłucia wirus namnaża się i wywołuje zmiany skórne [13]. Choroba powoduje znaczne straty w hodowli. Możliwą przyczyną jej zawleczenia na nasz kontynent jest transport chorych zwierząt, nasienia chorych buhajów lub owadów kłująco-ssących. Wirus jest dużym zagrożeniem dla bydła, ponieważ rozprzestrzenia się bardzo szybko. Polska jest wolna od choroby guzowatej skóry bydła. Istnieją jednak szczegółowe przepisy opisujące postępowanie w tej chorobie w razie jej zawleczenia na teren kraju (Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 22 stycznia 2003 r.) [82].

Ospa ptasia (Avian pox)

Ospa ptaków występuje u drobiu, gołębi, kanarków a także u wielu gatunków dzikich ptaków. Może być mechanicznie przenoszona przez komary lub przez bezpośredni kontakt między ptakami. Transmisja tego wirusa odbywa się przy udziale owadów krwiopijnych takich jak komary, a także pchły zasiedlające stare budki lęgowe. Jedyną możliwą drogą transmisji w zimie jest bezpośredni kontakt ptaków. Może on przykładowo nastąpić podczas walki o pokarm. Wirus wnika tylko przez uszkodzoną skórę. W przypadku wystąpienia ospy należy dokonać dezynfekcji karmnika oraz zaleca się przerwać dokarmianie [18]. Osobniki, które przechorowały ospę i podlegały hospitalizacji, stanowią potencjalnie źródło zakażenia dla innych ptaków. Infekcje łączone są z obecnością pcheł *Echidnophaga gallinarum*, bytujących na drobiu. Objawy mogą dotyczyć górnych dróg oddechowych i jamy ustnej zwłaszcza gdy wirus wnika do organizmu drogą aterogenną lub pokarmową. Charakterystyczne dla infekcji wirusowej są rozrostowe zmiany skórne, które są widoczne na nieopierzonej skórze (woskówka, dziób, kończyny) i mają tendencje do krwawień. Brak jest specyficznego leczenia, natomiast dostępna jest szczepionka przeciwko wirusowi ospy ptaków, mająca zastosowanie również u drobiu [6]. Ograniczenie importu ptaków egzotycznych znacznie zmniejszyło częstość występowania zakażeń Poxvirus u ptaków domowych.

Myksomatoza

Myksomatoza (Myxomatosis) to zakaźna wirusowa chorobą królików domowych i dzikich rzadziej zajęcy. Jest szeroko rozpowszechnioną na całym świecie. Wirusem, który wywołuje myksomatozę jest Leporipoxvirus. Może on przeżyć i pozostać zaraźliwy w organizmie pchły przez wiele miesięcy. Przenoszona jest mechanicznie między osobnikami przez owady krwiopijne, takie jak komary, wszy i pchły. Choroba występuje z reguły sezonowo. Zachorowania obserwuje się głównie w okresie od lipca do października. Związane jest to z żerowaniem w tym czasie owadów krwiopijnych [52]. Owady kłujące pełnią podstawową rolę w przenoszeniu choroby. Świadczy o tym fakt, że zimą króliki zakażone myksomatozą, które wykazują objawy choroby, nie zakażają zwierząt zdrowych, nawet gdy przebywają we wspólnej klatce. Ochrona królików przed komarami odgrywa główną rolę w zapobieganiu myksomatozie. Myksomatoza po raz pierwszy została zaobserwowana w Urugwaju pod koniec XIX wieku, u królików przywiezionych z Europy. Do

Polski dotarła około 50 lat temu, a pierwsze jej ogniska zostały stwierdzone przy czeskiej i niemieckiej granicy. Likwidacja wszystkich zwierząt w ognisku i wybijanie królików była skutecznym sposobem zwalczania tej choroby. W latach osiemdziesiątych myksomatoza objęła cały kraj. Zwalczanie choroby za pomocą uboju zwierząt stało się zbyt kosztowne, dlatego rozpoczęto stosowanie szczepień zapobiegawczych [35]. U zainfekowanych dzikich królików w Ameryce rozwijają się łagodne włókniaki. Gdy wirus dostanie się do populacji królików europejskich, zapadają one na ciężką, zwykle śmiertelną chorobę, która charakteryzuje się wysoką wiremią i postępującymi rozrostowymi zmianami skórnymi. Doprowadziło to do wykorzystania tego wirusa jako narzędzia w próbach biologicznej kontroli populacji królików w Europie i Australii. Kontrola populacji stała się jednak nieefektywna, ponieważ z czasem populacja europejskich królików rozwinęła odporność na użyte szczepy wirusa myksomatozy [6, 45].

3.5. Asfarwirusy Rodzina *Asfarviridae*

Wirusy DNA – zawierające dwuniciowy DNA (dsDNA)

Afrykański pomór świń

Wirus ASF (African swine Fever) jest zaliczany do arbowirusów, jest jedynym przedstawicielem rodzaju Asfivirus w obrębie rodziny Asfarviridae. Może być przenoszony między osobnikami drogą bezpośrednią i pośrednią. Jest to najgroźniejsza choroba trzody chlewnej, o przebiegu klinicznym ostrym. Afrykański pomór świń charakteryzuje się dużą śmiertelnością. Ze względu na duże ryzyko rozprzestrzeniania się choroby, leczenie z urzędu jest zabronione. Zwierzęta chore i podejrzane są eliminowane. Obowiązuje bezwzględny zakaz wwozu do kraju wolnego od choroby: świń, mięsa mrożonego oraz mięsa świeżego z krajów, w których występuje ta choroba. Afrykański pomór świń został odkryty w 1920 roku w Afryce. Pierwsze ogniska w Europie stwierdzono w roku 1957 w Hiszpanii i Portugalii, gdzie zostało wybitych tysiące zwierząt. Następnie choroba pojawiła się na Malcie oraz we Francji i Włoszech. W 2007 roku potwierdzone zostały pierwsze przypadki ASF w Gruzji, Armenii, Azerbejdżanie i Rosji. W latach 2012–2013 odkryto pojedyncze ogniska ASF na Ukrainie i Białorusi. W 2014 roku ASF stwierdzono na terenie Unii Europejskiej: na Litwie, w Polsce, Łotwie i Estonii. W Polsce chorobę potwierdzono na terenie północno-wschodnim w lutym 2014 r. u padłego dzika, który prawdopodobnie przedostał się z Białorusi. Wszystkie przypadki do końca 2015 roku na terenie kraju zlokalizowane były w pobliżu granicy z Białorusią na obszarze trzech powiatów – hajnowskiego, sokólskiego i białostockiego w województwie podlaskim. W 2016 roku choroba rozszerzyła się także w północnej części województwa lubelskiego oraz we wschodniej mazowieckiego [75, 94]. Wirus jest odporny na niskie i wysokie temperatury. Kłujące muchówki *Stomoxys calcitrans*, mogą mechanicznie przenosić wirus ASF między świniami. Doświadczalnie wirus afrykańskiego pomoru świń został przeniesiony na świnie przez zarażone muchy, w których przeżył przez co najmniej dwa dni bez widocznej utraty miana [66, 73]. Według najnowszych doniesień larwy muchówek *Diptera: Calliphoridae* żerujące na padlinie zarażonych dzików mogą także mechanicznie przenosić ASFV [26]. Wirus ASF przenoszony jest również przez kleszcze, które w naszej strefie klimatycznej nie odgrywają istotnej roli. Kleszcze *Ornithodorus porcinus* i *O. moubata* obecnie notowane są w Afryce oraz *O. erraticus* w Portugalii i Hiszpanii [17, 76].

4. Choroby bakteryjne przenoszone przez wektory owadzie

Tularemia

Tularemia (Tularemia) jest wysoce zakaźną chorobą odzwierzęcą. Zwana jest także chorobą zajęczą, dżumą gryzoni, bądź gorączką króliczą. Wywoływana jest przez Gram-ujemne, względnie tlenowe pałeczki *Francisella tularensis*. Rezerwuarem bakterii są małe gryzonie, szczury, myszy, nornice, wiewiórki, króliki, zające oraz dzikie ptactwo. *F. tularensis* jest jedną z najbardziej zakaźnych bakterii, może zostać użyta jako broń biologiczna [88]. Tularemia w niektórych krajach stanowi poważny problem epidemiologiczny. Źródło zakażenia stanowią zajęczaki i chore gryzonie lub nosiciele okresowo wydalający zarazek wraz z wydalinami i wydzielinami. Rolę w przenoszeniu odgrywają także wektory ożywione, takie jak muchy, komary z gatunku *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* a także pchły, bolimuszki, ślepaki, jusznice i bąki. W naturalnych warunkach rezerwuarem *F. tularensis* mogą być wiewiórki ziemne, szczury piżmowe, szczury wodne, króliki, zające, myszowate, nornice i inne gryzonie zanieczyszczające ściółkę oraz produkty stanowiące pokarm dla zwierząt i ludzi [14, 46, 49].

Bartonelloza

Bakteria *Bartonella henselae* powoduje chorobę kociego pazura u ludzi (Bartonellosis). Koty są głównym rezerwuarem *B. henselae* i *B. clarridgeiae*. Nosicielami wielu gatunków Bartonella, w szczególności *B. henselae* są pchły, głównie pchła kocia *Ctenocephalides felis felis*. *Bartonella* spp. stwierdzono również u much, lecz ich rola jako wektora w przenoszeniu zakażenia nie jest wyjaśniona. Na podstawie testów serologicznych stwierdzono, że *B. clarridgeiae* jest przy-

czyną chorób podobnych do choroby kociego pazura. *B. henselae* wraz ze swoim głównym przenosicielem *Ctenocephalides felis felis* występują na całym świecie. W populacjach kotów częstość zakażenia *Bartonella* jest różna. Zapobieganie zakażeniom *Bartonella* spp. jest możliwe dzięki ochronie przed infestacjami pcheł oraz zwalczaniu pcheł u zakażonych zwierząt [6, 25].

Anaplazmoza bydła

Choroba ta (bovine anaplasmosis, *anaplasma marginale*) jest przyczyną anemii i gorączki u bydła. Patogen może być także przenoszony mechanicznie przez krwiopijne muchówki (np. *Tabanus* spp.). Morule *A. marginale* znajdowane są w erytrocytach bydła [6].

5. Choroby pierwotniacze przenoszone przez wektory owadzie

Lejszmanioza

W Europie leiszmaniozę (Leishmaniasis) u psów wywołuje *Leishmania infantum*. Wektorami są muchówki z rodzaju *Phlebotomus* (podrodzina *Phlebotominae* – Ćmiankowate). Głównym rezerwuarem *L. infantum* są psy. Wiele innych gatunków ssaków może również ulec zarażeniu, w tym ludzie. Ćmiankowate są owadami szeroko rozpowszechnionymi w basenie Morza Śródziemnego, w Afryce i na Bliskim Wschodzie. Posiadają zdolność przystosowywania się do warunków tropikalnych i subtropikalnych, a nawet do środowisk całkowicie suchych. Endemiczne obszary dla *Phlebotomus perniciosus* rozciągają się do północnej Francji. *Leishmania* spp. cechują się wysoką swoistością w stosunku do wektora i są przenoszone przez ssące krew osobniki żeńskie wielu gatunków ćmiankowatych w trakcie odżywiania się na żywicielu [25]. Aktywność wektorów najwyższa jest w nocy. Rozwój pasożyta wewnątrz wektora trwa od 7 do 14 dni i jest zależny od temperatury powyżej 18°C. Głównym ryzykiem na terenach endemicznych jest kontakt z wektorem oraz nagromadzenie żywicieli będących rezerwuarami pasożytów. Do żywicieli zaliczamy psy żyjące na zewnątrz, psy bezdomne, psy pochodzące ze schronisk z terenów endemicznych oraz psy myśliwskie. Lejszmanioza występuje endemicznie w południowej Europie. Jednak opisano pojedyncze przypadki chorych psów, które nie podróżowały przez tereny endemiczne, ani na nich nie pozostawały [25, 29].

6. Choroby wywoływane przez nicienie przenoszone przez wektory owadzie

Dirofilarioza

Dirofilarioza (Dirofilariasis) to choroba pasożytnicza wywoływana przez nicienie Dirofilaria. Przenoszona jest w ciepłym klimacie przez komary. Niestety, okazało się, że od niedawna również polskie komary mogą roznosić larwy tego nicienia [59]. Choroba dotarła do Polski prawdopodobnie z południa Europy [91]. *Dirofilaria immitis* występuje w sercu u psów i kotów, to najbardziej patogeniczny gatunek. *D. Repens* natomiast wywołuje dirofilariozę podskórną i jest odpowiedzialny za zarażenia zoonotyczne w Europie [20, 85]. Filarie są pasożytami przede wszystkim psowatych, ale z uwagi na niską swoistość dla żywiciela ich wektorów, zarażonych może zostać wiele gatunków ssaków, w tym ludzie. Najważniejszymi ich wektorami występującymi w Europie są gatunki z rodzajów *Culex*, *Aedes* i *Anopheles*. Częstotliwość zarażeń wywoływanych przez *Dirofilaria* spp. zależy od czynników środowiskowych, takich jak temperatura, zagęszczenie populacji wektorów i obecność psów zarażonych mikrofilariami, które są głównymi rezerwuarami zarażenia [25]. *Dirofilaria immitis* jest pasożytem endemicznym w wielu krajach Europy południowo-wschodniej. W ostatnich latach zdarzyły się przypadki zarażenia wywoływane przez *D. repens* u psów, które nigdy nie opuszczały terytorium Niemiec, Austrii lub Polski [25, 91]. Zarażenia Dirofilarią u kotów występują na obszarach, na których odnotowuje się wysoką ekstensywność inwazji u psów. Znaczenie mają też warunki klimatyczne, w szczególności duża wilgotność, w której żywiciele pośredni chętnie się rozmnażają. Na terenach suchych i ciepłych liczba zachorowań jest niższa [28]. Ze względu na stopniowe ocieplanie się klimatu obserwujemy obecnie pojawianie się przypadków inwazji tymi pasożytami serca na terenie naszego kraju [19, 71, 91]. Dirofilarioza u psów została odnotowana już w Czechach, na Słowacji i na Węgrzech. Należy zwrócić szczególną uwagę na zwierzęta, podróżujące wraz z właścicielami po krajach południowej Europy. Niebezpieczeństwo, jakie pasożyt niesie dla człowieka, sprawia, że jego rozprzestrzenianie się powinno być zgłaszane [25].

7. Endosymbionty

Endosymbionty to mikroorganizmy, których środowiskiem życia jest inny organizm. Mają największe znaczenie w oddziaływaniach między owadami i bakteriami. Endosymbionty występują w przestworach międzykomórkowych, jamistych wgłębieniach lub mogą wnikać bezpośrednio do komórki gospodarza. W toku ewolucji doszło to powstania interakcji pomiędzy endosymbiontem a gospodarzem. Wyróżnia się fakultatywne i obligatoryjne endosymbionty. Pierwsze z nich występują pozakomórkowo w hemolimfie owada. Natomiast obligatoryjne endosymbionty żyją w komórkach owada zwanych bakteriocytami, które chronią bakterie przed działaniem komórek żernych gospodarza oraz hemolizyn. Symbiotyczne bakterie potrafią chronić swoich

gospodarzy także przed grzybowymi patogenami. Mają wpływ na utrzymanie prawidłowej kondycji zdrowotnej gospodarza, jego żywotności, odporności na patogeny i wysoką temperaturę a nawet chronią przed spadkiem liczebności innych symbiotycznych mikroorganizmów znajdujących się w ciele tego samego owada. W przewodzie pokarmowym owadów lub w mycetocytach i mycetomach mogą żyć różne drobnoustroje takie jak bakterie, pierwotniaki i grzyby. Umożliwiają one gospodarzom korzystanie z błonnika. Produkują aminokwasy, witaminy, związki chemiczne będące prekursorami feromonów a także enzymów niezbędnych podczas trawienia celulozy. Przenoszone są z pokolenia na pokolenie przez samice. Endosymbionty mogą również wnikać do komórek jajowych. Przerywanie symbiotycznych interakcji między bakteriami a owadami może być sposobem walki z owadami przenoszącymi chorobotwórcze dla zwierząt mikroorganizmy. Eliminacja endosymbiontów jest jednym ze znanych sposobów prowadzącym do śmierci owada. Inną możliwością są modyfikacje genetyczne mikroorganizmów, których zmieniony metabolizm prowadzi do zaburzenia cyklu życiowego owada [53, 89].

Wolbachia

Endosymbiotyczny organizm używany do walki z owadzimi wektorami chorób zakaźnych. Należy do Gram-ujemnych bakterii z rodziny *Anaplasmataceae*, bezwzględnych pasożytów wielu bezkręgowców, w tym owadów i nicieni. Żyje w cytoplazmie komórek zainfekowanego gospodarza. Na następne pokolenia przenoszona jest w komórkach jajowych. Jej obecność w jajach doprowadza do śmierci zarodka, z którego miałby rozwinąć się samiec albo powoduje zmianę płci zarodka na żeńską. Inną możliwością jest dopuszczanie do kojarzenia się zakażonych samców tylko z zakażonymi samicami. Zarodki obumierają gdy dojdzie do kojarzenia ze zdrową samicą. Jest to wynik tak zwanej niekompatybilności cytoplazmatycznej [97]. Pojawienie się tej bakterii w populacji prowadzi do znacznego skrócenia żywotności osobników nawet o 50% i znacznej redukcji liczby samców nawet o 99%. Gatunki należące do Wolbachia znajdowane są w wielu nicieniach np. *Dirofilaria immitis*, która jest czynnikiem etiologicznym robaczycy serca [6]. Istnieją sugestie na to, że gatunki Wolbachia odgrywają rolę w procesie zapalnym na tle dirofilariozy, a ich eliminacja daje w rezultacie zmniejszenie żywotności nicieni i mniejsze szanse na ich przetrwanie [6]. Wolbachia jest organizmem szeroko rozprzestrzenionym w świecie owadów. Atakuje różne ich grupy, szybko zasiedlając całe populacje. Naukowcy postanowili to wykorzystać do ograniczenia liczebności komarów roznoszących niebezpieczne choroby. Bakteria mimo, że atakuje bardzo wiele owadów, niechętnie zasiedla komary (*Aedes aegyptii*) roznoszące choroby [61, 79]. Znalezienie właściwego szczepu okazało się być kluczowe przy rozwiązaniu tego problemu. Badania przeprowadzono na szczepie MelPop atakującym muszki owocowe (*Drosophila melanogaster*). Aby zmienić jego nastawienie na komara przez trzy lata Wolbachie hodowano w jego komórkach. Sukces był całkowity. W ciągu kilku pokoleń zainfekowane zostały wszystkie hodowane w laboratorium komary i potwierdzono utrzymywanie się Wolbachii w zainfekowanej populacji przez następne 30 pokoleń. Kojarzenie się zakażonego samca z zdrową samicą doprowadzało do całkowitej śmiertelności zarodków, podczas gdy u zdrowych osobników wylęgowość sięgała 80% [48, 90].

8. Podsumowanie

Wzrost częstości chorób przenoszonych przez wektory głównie zależy od rosnącej populacji wektorów oraz ich rozprzestrzeniania na nowe obszary. Wciąż poznawane są nowe gatunki wektorów. Powiększa się teren zamieszkiwania i wzrost populacji zwierząt wolno żyjących, które są rezerwuarem wektorów. Zmiany biogeograficzne i klimatyczne także sprzyjają rozwojowi populacji wektorów. Globalne ocieplanie klimatu oraz ingerencja człowieka w przyrodę zdecydowanie ma wpływ na występowanie chorób zakaźnych. Choroby przenoszone przez owady odgrywają kluczową rolę w medycynie weterynaryjnej, powodując corocznie straty u zwierząt hodowlanych sięgające wielu miliardów dolarów. Klimat zmienia się zarówno w Europie, jak i na całym świecie. Polska wraz z większością Europy, położona jest w strefie klimatu umiarkowanego [16, 22]. Niektóre choroby zakaźne są bardzo wrażliwe na zmiany temperatury i wilgotności powietrza. Wzrost temperatury może stworzyć odpowiednie warunki do wzrostu i rozprzestrzeniania się wektorów. Konsekwencje tych zmian dla Europy są trudne do ocenienia, ale też są nieuniknione. Prawdopodobnie stanie się to poważnym zagrożeniem nie tylko w postaci występowania coraz częściej ekstremalnych zjawisk pogodowych, ale również w formie rozprzestrzeniania się chorób zakaźnych. Pojawienie się nowych chorób jest możliwe także ze względu na globalizację gospodarki, masowe migracje ludności, zarówno w celach turystycznych jak i zarobkowych, zmiany cywilizacyjne, zanieczyszczenie środowiska oraz udział ptaków wędrownych jako wektorów wirusa. Otwarcie granic handlowych oraz nieprzestrzeganie rygorów związanych z importem zwierząt z terenów na których choroba zakaźna występuje mają także bardzo duże znaczenie [43, 86, 87]. Jednak najważniejszym czynnikiem są zmiany klimatyczne, które prowadzą do wzrostu temperatury i obfitych opadów, stwarzając tym samym możliwość do adaptacji i rozmnażania się gatunków komarów. Przypuszcza

się, że w przyszłości zwiększy się częstotliwość zachorowań na tzw. choroby egzotyczne w Europie, jak również będą obserwowane przypadki zachorowań na choroby zakaźne, które wcześniej nie występowały (emerging infectious diseases) [22].

Piśmiennictwo

1. Adaszek Ł., Łyp P., Szczepaniak K., Skrzypek T., Winiarczyk S.: Komary jako wektory chorób ze szczególnym uwzględnieniem dirofilariozy psów. *Magwet*, https://magwet.pl/mw/27272,komary-jako-wektory-chorob-ze-szczegolnym-uwzglednieniem-dirofilariozy-psow (2018)
2. Anyamba A., Linthicum K.J., Tucker C.J.: Climate-disease connections: Rift Valley fever in Kenya. *Cad. Saude Publica.* **17**, 133–140 (2001)
3. Beer J. i in.: Choroby zakaźne zwierząt domowych 1980, Państwowe Wyd. Rolnicze i Leśne, tom I, 84–89 ISBN 83-09-00332-3
4. Bezirtzoglou C., Dekas K., Charvalos E.: Climate changes, environment and infection: Facts, scenarios and growing awareness from the public health community within Europe. *Anaerobe,* **17**, 337–340 (2011)
5. Bollino G.: Gorączka Zachodniego Nilu i japońskie zapalenie mózgu. *Wiad. Zoot.* **47**, 11–22 (2009)
6. Bowman D.D.: Georgis' Parasitology for Veterinarians, wyd. 9., Saunders, St. Louis, 2008, s. 244–253
7. Brinkmann A., Nitsche A. Claudia Kohl C.: Viral Metagenomics on Blood-Feeding Arthropods as a Tool for Human Disease Surveillance. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1743, 1–14 (2016)
8. Brown H.E.: Projection of Climate Change Influences on U.S. West Nile Virus Vectors. *Earth Interact.* **19**, 1–18 (2015)
9. Carn V.M.: The role of Dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses. *Br. Vet. J.* 152, 377–393 (1996)
10. Chamorro M.F., Passler T., Givens M.D., Edmondson M.A., Dwight F., Wolfe D.F., Paul H. Walz: Evaluation of transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) between persistently infected and naive cattle by the horn fly (Haematobia irritans). *Vet. Res. Commun.* **35**, 123–129 (2011)
11. Chen A.Y.S., Walker G.P., Carter D., Ng J.C.K.: A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector. *PNAS*, **108**, 16777–16782 (2011)
12. Chihota C.M, Rennie L.F., Kitching R.P., Mellor P.S.: Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Med. Vet. Entomol.* **17**, 294–300 (2003)
13. Chihota C.M, Rennie L.F., Kitching R.P., Mellor P.S.: Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by Aedes aegypti (*Diptera: Culicidae*). *Epidemiol. Infect.* **126**, 317–321 (2001)
14. Chróst A., Giaurowie K., Kałużewski S., Rastawicki W.: Występowanie zakażeń wywoływanych przez Francisella tularensis u ludzi w Polsce oraz laboratoryjna diagnostyka tularemii. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **69**, 55–63 (2017)
15. Ciota A.T.: West Nile virus and its vectors. *Curr. Opin. Insect Sci.* **22**, 28–36 (2017)
16. Clegg J.C.: Influence of climate change on the incidence and impact of arenavirus disease: a speculative assessment. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 504–509 (2009)
17. Costard S., Wiegand B., de Glanville W., Jori F., Rowlands R., Vosloo W., Roger F., Pfeiffer D.U., Dixon L.K.: African swine fever: how can global spread be prevented? *Phil. Trans. R. Soc. B.* **364**, 2683–2696 (2009)
18. Czujkowska A., Kruszewicz A.G.: Magazyn weterynaryjny, Choroby ptaków – monografia, 654–659 (2014)
19. Demiaszkiewicz A. W., Karamon J., Jasik A.: Przypadek wykrycia nicienia *Dirofilaria repens* w jądrze psa. *Med. Weter.* **69**, 124–127 (2013)
20. Di Cesare A., Otranto D., Di Giulio E., Simonato G., Latrofa M.S., La Torre F., Coccia G., Traversa D.: Microfilarial periodicity of Dirofilaria repens in naturally infested dogs. *Parasitol. Res.* **112**, 4273–4279 (2013)
21. Dick G.W.: Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 521–534 (1952)
22. Dopieralska P., Krukowski H.: Wpływ zmian klimatycznych na występowanie wybranych chorób zakaźnych. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu,* **23**, 152–157 (2017)
23. Du Toit R.M.: The transmission of bluetongue and horse sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **19**, 7–16 (1944)
24. Epstein P.R.: Climate change and emerging infectious diseases. *Microbes Infect.* **3**, 747–754 (2001)
25. ESCCAP (Europejska Rada ds. Parazytoz Zwierząt Towarzyszących): Zwalczanie chorób przenoszonych przez wektory u psów i kotów. Adaptacja przewodnika ESCCAP Nr 5. Wydanie drugie – wrzesień (2012)
26. Forth J.H., Amendt J., Blome S., Depner K., Kampen H.: Evaluation of blowfly larvae (*Diptera: Calliphoridae*) as possible reservoirs and mechanical vectors of African swine fever virus. *Transbound Emerg. Dis.* **65**, e210–e213 (2018)
27. Gavinelli A., Dilaveris D.: Lumpy skin disease (LSD) Epidemiological situation in Europe (update since LSD4). Standing Group of Experts on Lumpy Skin Disease in the South East Europe region under the GF-TADs umbrella Fifth meeting (SGE LSD5), Budva, Montenegro, 19–20 October 2017
28. Genchi C., Mortarino M., Rinaldi L., Cringoli G., Traldi G., Genchi M.: Changing climate and changing vector borne disease distribution: the example of dirofilaria in Europe. *Vet. Parasitol.* **176**, 295–299 (2011)
29. Gliński Z.: Czy leiszmanioza odzwierzęca zagraża Europie? *Życie Wet.* **91**, 155–160 (2016)
30. Gliński Z., Kostro K., Zoń M.T.: Choroba niebieskiego języka. *Życie Wet.* **83**, 380–383 (2007)
31. Gliński Z., Kostro K.: Czy gorączka Doliny Rift zagraża hodowli owiec i bydła w Europie? http://www.portalhodowcy.pl/hodowca-bydla-archiwum/178-hodowca-bydla11-11-2015/1915-czy-goraczka-doliny-rift-zagraza-hodowli-owiec-i-bydla-w-europie
32. Gliński Z., Kostro K.: Czy jest możliwe zakażenie zwierząt domowych wirusem Zika? *Życie Wet.* **91**, 228–231 (2016)
33. Gliński Z., Kostro K.: Gorączka Doliny Rift. *Życie Wet.* **84**, 885–887 (2009)
34. Gliński Z., Kostro K., Luft-Deptuła D.: Krwotoczna choroba zwierzyny płowej (EHD) – nowa choroba zakaźna podlegająca zwalczaniu na terenie Polski. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia* **60**, 59–67(2005)
35. Górski J., Mizak B., Chrobocińska M.: Control of rabbit myxomatosis in Poland. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **13**, 869–879 (1994)
36. Grubaugh N.D., Ebel G.D.: Dynamics of West Nile virus evolution in mosquito vectors. *Curr. Opin. Virol.* **21**, 132–138 (2016)
37. Gubler D.J.: Vector-borne diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **28**, 583–588 (2009)
38. Gunn H.M.: Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* **132**, 584–585 (1993)
39. Haddow A.D., Schuh A.J., Yasuda C.Y., Kasper M. R., Heang V., Huy R., Guzman H., Tesh R.B., Weaver S.C.: Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *Plos Neglect. Trop. D.* **6**, e1477 (2012)
40. Hayes E.B.: Zika Virus Outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1347–1350 (2009)

41. Henszel Ł., Janiec J., Izdebski R., Radziszewski F., Polański P.: Nowo pojawiające się choroby zakaźne niezwalczane drogą rutynowych szczepień na terenie Europy w latach 2010–2015 – przegląd powiadomień WHO i ECDC. *Przegl. Epidemiol.* **69**, 829–836 (2015)
42. Jaśkowski J.M., Gehrke M., Herudzińska M., Kierbić A., Kmiecik J.: Choroba guzowatej skóry bydła – nowe niebezpieczeństwo? *Przegląd hodowlany,* **2**, 13–16 (2017)
43. Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A., Storeygard A., Balk D., Fillteman J.L., Daszak P.: Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, **451**, 990–993 (2008)
44. Kaba J., Czopowicz M., Witkowski L.: Schmallenberg virus antibodies detected in Poland. *Transbound. Emerg. Dis.* **60**, 1–3 (2013)
45. Kerr P.J., Merchant J.C., Silvers L., Hood G.M., Robinson A.J.: Monitoring of spread of myxoma virus in rabbit Oryctolagus cuniculus populations on the southern tablelands of New South Wales, Australia. II. Selection of a strain of virus for release. *Epidemiol. Infect.* **130**, 123–133 (2003)
46. Kilic A.U., Mehmet Doganay: Tularemia: A re-emerging disease. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* **60**, 275–280 (2013)
47. Kilpatrick A.M., Randolph S.E.: Zoonoses 2 Drivers, dynamics, and control of emerging vectorborne zoonotic diseases. *Lancet*, **380**, 1946–1955 (2012)
48. Klasson L., Westberg J., Sapountzis P., Näslund K., Lutnaes Y., Darby A.C., Veneti Z., Chen L., Braig H.R., Garrett R., Bourtzis K., and Andersson Siv G.E.: The mosaic genome structure of the Wolbachia wRi strain infecting *Drosophila simulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5725–5730 (2009)
49. Kłapeć T., Cholewa A.: Tularemia – wciąż groźna zoonoza. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, **17**, 155–160 (2011)
50. Kramer L.D.: Complexity of virus – vector interactions. *Curr. Opin. Virol.* **21**, 81–86 (2016)
51. Krzysiak M.K., Iwaniak W., Kęsik-Maliszewska J., Olech W., Larska M.: Serological study of exposure to selected arthropod-borne pathogens in European bison (*Bison bonasus*) in Poland. *Transbound Emerg. Dis.* **64**, 1411–1423 (2017)
52. Kwit E., Chrobocińska M., Bigoraj E.: Myksomatoza królików, problem nadal aktualny. *Życie Wet.* **86**, 956–960 (2011)
53. Kubiak K., Sielawa H., Chen W., Dzika E.: Endosymbiosis and its significance in dermatology. JEADV DOI: 10.1111/jdv.14721 (2017)
54. Larska M., Jasik A., Żmudziński J.F.: Przypadki kliniczne zakażeń wirusem Schmallenberg w Polsce. *Med. Weter.* **69**, 428–431 (2013)
55. Larska M., Lechowski L., Grochowska M., Żmudziński J.F.: Detection of the Schmallenberg virus in nulliparous *Culicoides obsoletus/scoticus* complex and *C. punctatus*-the possibility of transovarial virus transmission in the midge population and of a new vector. *Vet. Microbiol.* **166**, 467–473 (2013)
56. Larska M., Polak M.P., Grochowska M., Lechowski L., Związek J.S., Żmudziński J.F.: First report of Schmallenberg virus infection in cattle and midges in Poland. *Transbound. Emerg. Dis.* **60**, 97–101 (2013)
57. Larska M., Tarkowska K., Kuta A., Fidler-Kwiatek E., Ciastek M., Żmudziński J.F.: Obraz kliniczny zakażeń wirusem Schmallenberg. *Życie Wet.* **88**, 488–492 (2013)
58. Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna, Państwowe Wyd. Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1975, s. 521–522
59. Masny A., Sałamatin R., Wioletta Rożej-Bielicka W., Gołąb E.: Is molecular xenomonitoring of mosquitoes for *Dirofilaria repens* suitable for dirofilariosis surveillance in endemic regions? *Parasitol. Res.* **115**, 511–525 (2016)
60. McDermott E.G., Mayo C.E., Gerry A.C, Laudier D., MacLachlan N.J., Mullens B.A.: Bluetongue virus infection creates light averse *Culicoides* vectors and serious errors in transmission risk estimates. *Parasite. Vector.* **8**, 1–9 (2015)
61. McMeniman C.J., i in.: Stable Introduction of a Life-Shortening Wolbachia Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, **323**, 141–144 (2009)
62. Mejssner M.: Denga i Gorączka Zachodniego Nilu – nowe zagrożenia w Europie. http://www.medonet.pl/zdrowie/zdrowie-dla-kazdego,denga-i-goraczka-zachodniego-nilu---nowe-zagrozenia-w-europie,artykul,1701426.html
63. Mellor P.S.: The Replication of Bluetongue Virus in Culicoides Vectors. (w) Bluetongue Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 162, red. P. Roy, B.M. Gorman Springer, Heidelberg, 1990, s. 143–161
64. Mellor P.S., Hamblin, C. African horse sickness. *Vet. Res.* **35**, 445–466 (2004)
65. Mellor P.S., Boned J., Hamblin C., Graham S.: Isolations of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. *Epidemiol. Infect.* **105**, 447–454 (1990)
66. Mellor P.S., Kitching R.P., Wilkinson P.J.: Mechanical transmission of African swine fever virus and capripox virus by *Stomoxys calcitrans*. *Res. Vet. Sci.* **43**, 109–112 (1987)
67. Mills M.K., Michel K., Pfannenstiel R.S., Ruder M.G., Veronesi E., Nayduch D.: *Culicoides* – virus interactions: infection barriers and possible factors underlying vector competence. *Curr. Opin. Insect Sci.* **22**, 7–15 (2017)
68. Morens D.M., Gregory K. Folkers G.K., Fauci A.S.: The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, **430**, 242–249 (2004)
69. Morin C.W., Comrie A.C.: Modeled response of the West Nile virus vector Culex quinquefasciatus to changing climate using the dynamic mosquito simulation model. *Int. J. Biometeorol.* **54**, 517–529 (2010)
70. Morin C.W., Comrie A.C.: Regional and seasonal response of a West Nile virus vector to climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 15620–15625 (2013)
71. Niziołek R., Rutkowska K.: Dirofilarioza u psów i kotów. *Życie Wet.* **84**, 798–805 (2009)
72. Liberski P.P., Sikorska B., Bartosiewicz-Wąsik J., Smoleń J., Wąsik T.J., Kruszyński P.: Arbowirusy. *Aktualn. Neurol.* **7**, 85–95 (2007)
73. Olesen A.S., Lohse L, Hansen M.F., Boklund A., Halasa T., Belsham G.J., Rasmussen T.B., Bøtner A., Bødker R.: Infection of pigs with African swine fever virus via ingestion of stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Transbound Emerg. Dis.* 1–6 (2018)
74. Orłowska A., Trębas P, Smreczak M., Marzec A., Żmudziński J.F.: First detection of bluetongue virus serotype 14 in Poland. *Arch. Virol.* **161**, 1969-1972 (2016)
75. Pejsak Z., Niemczuk K., Kowalczyk A., Woźniakowski G., Kozak E., Bocian Ł., Śmietanka K.: Osiemnaście miesięcy afrykańskiego pomoru świń w Polsce. *Życie Wet.* **90**, 640–644 (2015)
76. Penrith M.-L., Guberti V., Depner K., Lubroth J.: Preparation of African swine fever contingency plans. Chapter 3: Risk analysis. FAO, Rome, 2009
77. Pomorska D., Kuchar E.: Zakażenie wirusem Zika – nowe zagrożenie epidemiczne. *Pediatr. Med. Rodz.* **12**, 150–156 (2016)
78. Popiel M., Sygitowicz G., Laskus T.: Wirus Zachodniego Nilu. *Post. Mikrobiol.* **53**, 335–344 (2014)
79. Ritchie S.A., van der Hurk A.F., Smout M.J., Staunton K.M., Hoffmann A.A.: Mission accomplished? We need a guide to the "post release" world of Wolbachia for Aedes-borne disease control. *Trepar,* **1715**, 1–10 (2017)
80. Rola J., Polak M., Żmudziński J.F.: 2016 – Aktualne dane na temat sytuacji epizootycznej w zakresie choroby guzowatej skóry bydła. *Życie Wet.* **91**, 897–899.
81. Rossati A.: Global warming and its health impact. *Int. J. Occup. Environ. Med.* **8**, 7–20 (2018)

82. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 22 stycznia 2003 r. Dz.U. nr 18, poz. 163, 2003
83. Saegerman C., Berkvens D., Mellor P.S.: Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 539–544 (2008)
84. Sailleau C., Boogaerts C., Meyrueix A., Laloy E., Bréard E., Viarouge C., Desprat A., Vitour D., Doceul V., Boucher C., Zientara S., Nicolier A., Grandjean D.: Schmallenberg virus infection in dogs, France, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1896–1898 (2013)
85. Sapierzyński R., Wojtczak M.: Dirofilarioza podskórna u psów. *Życie Wet.* **89**, 478–483 (2014)
86. Sellers R.F.: Weather, host and vector – their interplay in the spread of insect-borne animal virus diseases. *J. Hyg.* **85**, 65–102 (1980)
87. Semenza J.C., Menne B.: Climate change and infectious disease in Europe. *The Lancet Inf. Dis.* **9**, 365–375 (2009)
88. Sjöstedt A.: Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1105**, 1–29 (2007)
89. Syller J.: Mechanizmy przenoszenia wirusów roślinnych i zwierzęcych przez stawonogi. *Kosmos*, **50**, 29–38 (2001)
90. Szablewski. P.: Wolbachia – bakteria zmieniająca płeć owadów. http://www.biotechnolog.pl/wolbachia-bakteria-zmieniajaca--plec-owadow (07.07.2009)
91. Świątalska A., Demiaszkiewicz A.W.: Pierwszy w Polsce rodzimy przypadek inwazji nicieni Dirofilaria immitis u psa. *Życie Wet.* **87**, 685–686 (2012)
92. Tasioudi K.E., Antoniou S.E., Iliadou P., Sachpatzidis A., Plevraki E., Agianniotaki E.I., Fouki C., Mangana-Vougiouka O., Chondrokouki E., Dile C.: Emergence of lumpy skin disease in Greece, 2015. *Transbound. Emerg. Dis.* **63**, 260–265 (2016)
93. Thompson G.M., Jess S., Murchie A.K.: A review of African horse sickness and its implications for Ireland. *Ir. Vet. J.* **65**, 9 (2012)
94. Truszczyński M., Pejsak Z.: Sytuacja epidemiologiczna afrykańskiego pomoru świń w krajach graniczących od wschodu z Unią Europejską. *Życie Wet*. **89**, 560–563 (2014)
95. Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. „O ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt" (Dz. U. z dnia 20 kwietnia 2004 r.)
96. Verwoerd D.W.: Definition of a vector and a vector-borne disease. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **34,** 29–31 (2015)
97. Youle M.: https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/01/wolbachia-infection-a-good-thing.html (2009)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 398–402
http://www.pm.microbiology.pl

INDUSTRIAL APPLICATIONS OF WILD AND GENETICALLY-MODIFIED STRAINS OF ACETIC ACID BACTERIA

Lidia Stasiak-Różańska*, Milena Kupiec

Department of Biotechnology, Microbiology and Food Evaluation, Faculty of Food Sciences,
Warsaw University of Life Sciences

Submitted in April, accepted in September 2018

Abstract: Acetic Acid Bacteria (AAB) have been known for many years, since humans first used them to produce vinegar. AAB serve as biocatalysts in industrial production of, inter alia, acetic acid, dihydroxyacetone, gluconic acid, bacterial cellulose or levan. Apart from the traditional industrial applications of wild strains of AAB, scientists strive to develop novel methods for the production of selected compounds using genetically-modified AAB. The application of such mutants in the industry entails both positive and negative aspects. Modifications of the bacterial genome have a significant effect upon the functioning of the entire cell. This review presents industrial applications of metabolites produced by both wild and genetically-modified strains of AAB.

1. Application of wild strains of AAB in the industry. 2. Application of genetically-modified strains of AAB in the industry. 3. Opinion on GMOs used in industry. 4. Summary

PRZEMYSŁOWE ZASTOSOWANIE DZIKICH I GENETYCZNIE ZMODYFIKOWANYCH SZCZEPÓW BAKTERII OCTOWYCH

1. Przemysłowe zastosowanie dzikich szczepów bakterii octowych. 2. Przemysłowe zastosowanie genetycznie zmodyfikowanych szczepów bakterii octowych. 3. Powszechna opinia na temat organizmów zmodyfikowanych genetycznie stosowanych w przemyśle. 4. Podsumowanie

Streszczenie: Bakterie kwasu octowego znane są od wielu lat, od kiedy ludzie po raz pierwszy wykorzystali je do wytworzenia octu. Bakterie octowe biorą udział w produkcji wielu związków o dużym znaczeniu przemysłowym, m.in. kwasu octowego, dihydroksyacetonu, kwasu glukonowego oraz celulozy mikrobiologicznej. Oprócz tradycyjnych kierunków wykorzystania potencjału biochemicznego dzikich szczepów bakterii octowych, coraz więcej uwagi poświęca się badaniom nad konstruowaniem zmodyfikowanych genetycznie szczepów o zwiększonych możliwościach wytwarzania określonych metabolitów. Zastosowanie mutantów bakteryjnych w przemyśle wzbudza wśród społeczeństwa zarówno pozytywne jak i negatywne odczucia. W artykule przedstawiono zastosowanie dzikich szczepów bakterii octowych oraz opisano możliwości przemysłowej aplikacji genetycznie zmodyfikowanych szczepów tych mikroorganizmów.

Key words: AAB, acetic acid, genetic modifications, mutant
Słowa kluczowe: bakterie octowe, kwas octowy, modyfikacje genetyczne, mutant

1. Application of wild strains of AAB in the industry

Acetic acid bacteria (AAB) are Gram-negative, non-spore-forming, aerobic bacilli [40]. The optimal temperature for their growth ranges from 25 to 35°C, and optimal pH – from 5.4 to 6.3 [11, 28]. AAB are chemoorganotrophs [26]. They may develop in an environment with high osmotic pressure, e.g. in fruits and fruit juices, nectars, bee honeys, ciders or beers [8, 29].

A typical trait of all AAB is its capability of producing acids that are formed as the terminal or transient products of oxidation of alcohols and carbohydrates. The key compounds produced by AAB include: acetic acid, bacterial cellulose, dihydroxyacetone, gluconic acid and levan [30, 33, 35, 38]. These bacteria are also promising starter cultures, used either to better control known food fermentation processes or to produce novel fermented foods and beverages. They play an important role in natural food fermentation processes such as lambic beer, water kefir, kombucha, and cocoa [6].

The most popular product obtained from AAC is vinegar. This compound is mainly used for food preservation, but also for flavour enhancement of dishes. Vinegar is additionally used for the preparation of sauces, mayonnaises and mustards. It improves the sensory attributes of a ready product, and, through its acidifying medium, enables the preservation of food [29].

Recently, there has been a big increase in interest and research regarding the obtaining of bacterial cellulose (BC, also known as microbial cellulose). BC exists as a basic structure of fibril that consist of a β-1,4-glucan chain with the molecular formula $(C_6H_{10}O_5)n$. The glucan chains are held together by inter- and intra-hydrogen bonding. Microfibryls of BC are about 100 times smaller than plant cellulose [9]. Moreover, the three dimensional structure of BC is much more

* Autor korespondencyjny: Lidia Stasiak-Różańska, Department of Biotechnology, Microbiology and Food Evaluation, Faculty of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159c, bld. 32, 02-776 Warsaw; tel. + 48 22 59 33 76 64; e-mail: lidia_stasiak@sggw.pl

organized compared to the structure of plant cellulose [22]. Sheets of dried BC have better mechanical properties compared with traditional paper obtained with the addition of plant cellulose [31].

Bacterial cellulose is called "the material of the future" due to its wide application in various branches of industry and medicine [12]. In 1992, BC was acknowledged to be a compound safe to human health and life by the Food and Drug Administration (FDA) [24]. BC does not enter into reactions with substances contained in food products, owing to which it does not change their organoleptic properties. It remains stable in a wide range of pH values and temperatures; hence, it may be applied to produce food packages [24]. Microbiological cellulose may also be used as a fat substitute for the production of low-calorie food products. It is non-toxic and resistant to mechanical damage, whereas its structure is semi-permeable, which allows its use as a stabilizing agent of suspensions and as a filler in food products with greasy consistency [5]. Currently, this biopolymer is produced by wild strains of AAB belonging to the *Komagataeibacter xylinus* (previously *Gluconacetobacter xylinus*) and *Gluconobacter oxydans* species [12, 19]. The synthesis of BC is possible thanks to cellulose synthase complex (CS complex), which is well-structured machinery. The CS complex includes a series of subunits working in a concerted way that synthetize and export the β-glucan chains in the extracellular space [12].

Another interesting substance of industry importance, produced by wild strains of AAB (e.x. *G. oxydans*), is dihydroxyacetone (DHA). DHA is a product of the microbiological oxidation of glycerol, catalyzed by bacterial membrane-bound glycerol dehydrogenase [35]. The most common traits of DHA are the formation of colour compounds as a result of contact with human skin; therefore, it is applied as an active ingredient of tanning cosmetics [7].

Some wild strains of AAB, including *G. oxydans*, are able to oxidize glucose to gluconic acid, which also finds applications in food production. This organic acid can play a significant role in the acidification of food products as well as being a preserving agent. It is also applied to produce artificial honey, cheese, and sausages [25]. Another, less popular but still important application of AAB, is the production of levan (homopolysaccharide of fructan type with β-(1-6) glycosidic linkages). Some strains of AAB ex. *Kozakia baliensis* DSM 14400, *Neoasaia chiangmaiensis* NBRC 101099, can play a significant role in producing buckwheat-sourdough bread [37]. Ua-Arak *et al.* [36] have demonstrated the possibility of using selected strains of AAB in gluten-free sourdough production, which contained levan in situ [18, 37].

Apart from the well-known biochemical potential of AAB strains, scientists are still searching for new methods to improve the industrial application of AAB. New research involves molecular techniques to increase the microbial production of compounds obtained from these bacteria.

2. Application of genetically-modified strains of AAB in the industry

Genetic modifications of bacteria allow many problems faced during the application of wild strains in the industry and medicine to be solved. The isolation and characterization of mutants expands the knowledge of the metabolic pathways running in bacterial cells. The industrial application of genetically-modified strains of AAB enables the production of a specified metabolite and, at the same time, minimizing or eliminating troublesome by-products and compounds contaminating the natural environment [17, 20].

Ethanol oxidation is primarly catalyzed by aldehyde dehydrogenase (ALDH). It is expected that the increased level of this enzyme, caused by the dosage effect from cloned ALDH genes, brings about an increase in the ethanol oxidation rate. The ALDH gene was cloned from *A. polyoxogenes* and integrated into a vector that was constructed from a plasmid indigenous to *Acetobacter* and introduced into strain NBI 2099, isolated from commercially available vinegar and identified as *A. aceti*. The mutant showed increased ALDH activity, which resulted in higher acetic acid productivity. The mutant concomitantly produced a higher concentration of acetic acid than the wild strain (causing 2-fold increases in the production rate and in the maximum concentration of acetic acid) [10].

Habe *et al.* [13, 15] facilitated the mutation of AAB from the species *Gluconobacter frateurii*. The wild strain was carrying out biotransformation of glycerol to glyceric acid, while glycerol dehydrogenase (GlyDH, EC 1.1.99.22) was catalyzing the oxidation of substrate to DHA, which was accumulated in bacterial cells [13–15]. In order to facilitate the recovery of pure gluconic acid from the post-reaction mixture, the *sldA* gene encoding GlyDH was removed from the genome of *G. frateurii*. The resultant deletion mutants were characterized by a higher production of glyceric acid (12.5 g/L) compared to the wild strains (9.8 g/L), and the final product was free of DHA, which facilitated its recovery [15].

Another species of AAB subjected to genetic modification in order to inhibit the synthesis of an undesirable compound was *Gluconacetobacter europaeus*. Bacteria of these species are commonly applied for the production of rice vinegar [1]. The organoleptic properties of the finished product are affected by the raw material subjected to the fermentation process and by multiple chemical substances synthesized during its microbiological production. One of them is acetoin:

a volatile compound with a strong buttery-creamy aroma, that is undesirable in Japanese rice vinegar and sake [1]. Various strains of *G. europaeus* bacteria have been modified to ensure a high quality of these products. Genome modifications consisted mainly of the impairment of the activity of enzymes that catalyzed respective biochemical transformations in the acetic acid synthesis pathway. For instance, the *aldC* gene that encoded α-acetolactose decarboxylase (EC. 4.1.1.5) – an enzyme catalyzing the transformation of α-acetolactate to acetone – was removed from the genome of *G. europaeus* KGMA4004 bacteria. The resultant deletion mutant of *G. europaeus* KGMA4004 was characterized by acetoin production lower by ca. 30%, compared with the non-mutated strain [1].

In some cases, the application of genetically-modified AAB in the industry allows a reduction of costs usually incurred for the production of specified chemical compounds with traditional microbiological methods. Many mutants are capable of utilizing components of cheap culture media in the form of, for example, post-production wastes for their growth. One of the means to minimize the costs of bacterial cellulose production may be the application of a cheap and easily available substrate, e.g. lactose [3]. This saccharide occurs in cheese whey, which is a by-product of the cheese making process. The global production of whey is estimated to exceed 145×10^6 t annually, and only half of this is converted into usable products [32, 39]. Whey is characterized by a high biological oxygen demand (BOD above 30 kg/m^3) and a high demand for chemical oxygen (above 60 kg/m^3), [3] owing to which it poses a serious problem to the natural environment. Whey is managed through the microbiological fermentation of lactose, and products of its transformation include, i.a., lactic acid, gellan, and ethanol. *E. coli* bacteria display the activity of β-galactosidase (EC. 3.2.1.108), which catalyzes the hydrolysis of lactose to glucose and galactose. β-galactosidase is encoded by the *lacZ* gene [3]. It was demonstrated that when the *lacZ* gene from *E. coli* was transferred to *Acetobacter xylinus*, this mutant was capable of growing on whey, by consuming 85% of its lactose (for 4 days of culture), and simultaneously produced 0.78 g/L of pure cellulose [3]. The use of genetically-modified cells of *A. xylinus* on an industrial scale could greatly facilitate whey management.

A positive aspect of the industrial application of genetically-modified acetic acid bacteria is better utilization of culture medium components and enhancement of the activity of some enzymes produced by these microorganisms. To achieve this, cells of *G. frateurii* THD32 strain bacteria were subjected to mutation [34]. The modification consisted of the removal of the *sboR* gene responsible for the regulation of *sldSLC* gene transcription (encoding the flavin adenine dinucleotic dependant on D-sorbitol dehydrogenase FAD-SLDH). Wild strains of the genus *Gluconobacter* are characterized by their capability to oxidize different saccharides and alcohols and to accumulate appropriate products of these reactions, and by a low effectiveness of biomass production [34]. The deletion mutant of *G. frateurii* THD32Δ*sboR* exhibited better growth on D-sorbitol and L-sorbose compared with the parental organisms. It was also characterized by an almost twofold higher activity of NADPH-dependent L-sorbose reductase (EC. 1.1.1.289), responsible for the assimilation of L-sorbose being a significant link during ascorbic acid production [34].

Genetic modifications have allowed the improving *G. oxydans* strain the capability to produce dihydroxyacetone [2, 13, 23]. The main problem encountered during DHA production is the inhibition of the metabolic activity of bacteria caused by the improper choice of substrate concentration and an increasing concentration of the product [2]. *G. oxydans* produce DHA and glyceric acid at the same time. These reactions are catalyzed by glycerol dehydrogenase (EC. 1.1.1.6) and alcoholic dehydrogenase (EC. 1.1.1.1), respectively. It was demonstrated that the *G. oxydans* mutant, deprived of the gene encoding the alcoholic dehydrogenase (Δ*adhA*), became capable of growing in the medium with a high glycerol concentration (150 g/L) and, simultaneously, of producing DHA with the concentration of 125 g/L [13].

Apart from beneficial effects, the application of genetically-modified microorganisms may have some negative outcomes. It sometimes happens that the intended modifications of the genome initiate the uncontrolled mutations. Discontinuity of a specified gene may, for example, cause enhanced expression of another gene. The literature reports on some cases of mutations that failed to bring the expected outcomes. An example may be mutants of *G. oxydans*, which, despite achieving novel, desirable traits, were losing the primary ones that had earlier been exploited in the pharmaceutical industry [21]. Genetic modification consisted of removing genes responsible for the synthesis of enzymes: self-dependent glucose dehydrogenease associated with the cytoplasmic membrane (*mgdH*) and cytoplasmic glucose dehydrogenase (*mgdH sgdH*) inactivated with it. Recombinants of *G. oxydans* N44-1 Δ*mgdH* and *G. oxydans* N44-1 Δ*mgdH sgdH* produced a higher (compared to the wild strain) biomass yield in the culture medium with glucose; however, they lost their capability to convert 2,5-diketogluconate and 2-ketogluconate that are substrates in vitamin C production [21].

Genetic modifications consisting of the removal of a specified fragment of a bacterial genome may inhibit the action of a gene encoding typical traits of the organ-

ism. Such a change in the metabolism was observed in one of the strains of AAB: namely in the *G. frateurii* mutant [34]. These bacteria were deprived of the *sboR* gene, which encoded the enzyme being responsible for the regulation of transcription of another gene (*sld-SLC*) indispensable for the production of L-sorbose from D-sorbitol. Compared with the wild strain, the mutant of *G. frateurii* was characterized by enhanced activity of the NADPH-SR enzyme responsible for the assimilation of L-sorbose and for decreased dynamics of action of NAD-SLDH catalyzing D-sorbitol oxidation to D-fructose [34].

An example of the undesirable (from the perspective of the food industry) effect of genetic modifications on the production of selected chemical compounds is also the mutation of *G. oxydans* IFO 12528 [14]. This strain is capable of producing glyceric acid from glycerol in the presence of alcoholic dehydrogenase (mADH), which is, in turn, encoded by the *adhA* gene. The action of mADH is based on ethanol oxidation to acetic aldehyde, which is next converted into acetic acid under the influence of aldehyde dehydrogenase (mALDH). The genetic modification of *G. oxydans* 12528, consisting of the cutting out of the *adhA* gene, caused the halt of acetic acid production from ethyl alcohol and lowered by half the production of glyceric acid, which was still being produced despite the absence of mADH. Study results suggest that another enzyme could be present in the mutant's cells, that could take part in the production of glyceric acid [14].

3. Opinion on GMOs used in industry

Genetically modified organisms still have a rather bad reputation in Europe. The anti-GMO lobby accuses proponents of this technology of pushing the introduction of GMOs into agriculture without adequately considering health and environmental risks. The pro-GMO camp charges its opponents with blowing potential risks out of proportion in order to manipulate public opinion against this new technology. During this mutual finger pointing, both sides have taken to blaming the public for a lack of understanding [27]. Consumers worldwide are displaying limited understanding, misconceptions, and even unfamiliarity with GMO food products. In The United States, GMO labelling is obligatory (similar to current European standards); however, consumer awareness of current GMO labelling is still low [41]. The 48% of respondents said that they knew very little about GMOs, whereas 16% felt they knew nothing at all, compared with 30% knowing a fair amount and just 5% knowing a great deal about GMOs [16]. It seems that the coming years may see exponential increases in GMO product development, as researchers gain increasing access to genomic resources that are applicable to organisms beyond the scope of individual projects. It is generally thought that genetic engineering is the inevitable wave of the future, and that we cannot afford to ignore a technology that has such enormous potential benefits [4].

4. Summary

The wild strains of AAB are commonly applied in various branches of industry. The same genetically-unmodified strains have been used for the production of vinegar for years. The industrial application of chemical compounds, that were produced with microbiological methods exploiting wild strains of AAB, does not generate any negative emotions among consumers.

Thus far, achievements of genetic engineering in studies addressing acetic acid bacteria have enabled better recognition of their metabolic pathways. In addition, they have contributed to imparting novel traits to these microorganisms, thereby making them producers of many valuable compounds (e.g. dihydroxyacetone, bacterial cellulose).

To apply recombinant DNA technology to improving AAB to an even greater extent, further research concerning gene expression, protein engineering, and other fundamental studies are required. Progress in process development is also indispensable for exhibiting the potential of recombinant bacteria.

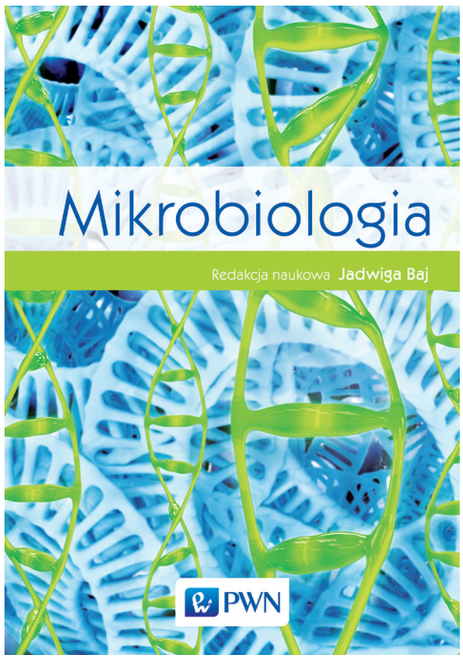
Scientific research indicates that the mutated and characterized strains of acetic acid bacteria may be successfully applied to produce important compounds in processes that are more effective, economically profitable and safer to the environment compared with traditional ones. However, for many scientific experts and ordinary people the question: "what are the risks of tampering with mother nature?" will remain open for the next few years.

References

1. Akasaka N., Sakoda H., Hidese R., Ishii Y., Fujiwarab S.: An Efficient Method Using *Gluconacetobacter europaeus* To Reduce an Unfavorable Flavor Compound, Acetoin, in Rice Vinegar Production. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 7334–7342 (2013)
2. Almeida J., Fávaro L.: Quirino B. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnol. Biofuel.* **5**, 5–48 (2012)
3. Battad-Bernardo E., McCrindle S.L., Couperwhite I., Neilan B.A.: Insertion of an *E. coli lacZ* gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 253–260 (2004)
4. Bawa A.S., Anilakumar K.R.: Genetically modified foods: safety, risks and public concerns-a review. *J. Food. Sci. Technol.* **50**, 1035–1046 (2013)

5. Chawla P.R., Bajaj B.I., Survase S.A., Singhal R.S.: Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 107–124 (2009)
6. De Roos J., De Vuyst L.: Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr. Opinion Biotechnol.* **49**, 115–119 (2018)
7. Draelos M.D., Zoe D.: Self-Tanning Lotions: Are they a healthy way to achieve a tan?. *Am. J. Clin. Dermatol.* **3**, 317–318 (2002)
8. Ehrenreich A.: The Genome of Acetic Acid Bacteria (in) Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, red. H. König, G. Unden, J. Fröhlich, Springer-Verlag, Berlin, 2009, p. 379–394
9. Esa F., Tasirin S.M., Rahman N.A.: Overview of bacterial cellulose production and application. *Agric. Agric. Sci. Proc.* **2**, 113–119 (2014)
10. Fukaya M.: Vinegar: Genetic Improvement of Acetobacter and Gluconobacter, Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications, red. Y. Murooka, T. Imanaka, Marcel Dekker, New York, 1994, p. 529–538.
11. Guillamón J.M., Mas A.: Acetic Acid Bacteria (in) Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, red. H. König, G. Unden, J. Fröhlich. Springer-Verlag, Berlin, 2009, p. 31–46
12. Gullo M., La China S., Falcone P.M., Giudici P.: Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI: 10.1007/s00253-018-9164-5 (2018)
13. Habe H., Fukuoka,T., Morita T., Kitamoto D., Yakushi T., Matsushita K., Sakaki K.: Disruption of Membrane-Bound Alcohol Dehydrogenase-Encoding Gene Improved Glycerol Use and Dihydroxyacetone Productivity in *Gluconobacter oxydans*. *ISBA,* **74**, 1391–1395 (2010)
14. Habe H., Sato S., Fukuoka T., Kitamoto D., Sakaki, K.: Effect of Membrane-bound Aldehyde Dehydrogenase-encoding Gene Disruption on Glyceric Acid Production in *Gluconobacter oxydans*. *J. Oleo. Scienc.* **63**, 953–957 (2014)
15. Habe H., Shimada Y., Fukuoka T., Kitamoto D., Itagaki M., Watanabe K., Yanagishita H., Yakushi T., Matsushita K., Sakaki K.: Use of *Gluconobacter frateurii* mutant to prevent dihydroxyacetone accumulation during Glyceric Acid Production from Glycerol. *Biosci Biotechnol. Biochem. ISBA* **74**, 2330–2332 (2010)
16. Hallman W., Hebden W., Cuite C., Aquino H., Lang J.: Americans and GM food: knowledge, opinion & interest in 2004. New Brunswick (NJ): Rutgers, the State University of New Jersey, Food Policy Institute Nov Report No. RR-1104–007 (2004)
17. Han L.: Genetically Modified Microorganisms (in) The GMO Handbook, ed. S.R. Parekh, Humana Press, Totowa, 2004
18. Hermann M., Petermeier H., Vogel R.: Development of novel sourdoughs with *in situ* formed exopolysaccharides from acetic acid bacteria. *Europ. Food Res. Technol*. **241**, 1–13 (2015)
19. Hu S.Q., Gao Y.G., Tajima K., Sunagawa N., Zhou Y., Kawano S., Fujiwara T., Yoda T., Shimura D., Satoh Y., Munekata M., Tanaka I., Yao M.: Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17957–17961 (2010)
20. Jurkiewicz A.: Genetyczne modyfikacje organizmów – biotechnologiczny eksperyment na organizmach żywych. *Med. Og. Nauk Zdr*. 18, 236–242 (2012)
21. Krajewski V., Simic P., Mouncey N.J., Bringer S., Sahm H., Bott M.: Metabolic Engineering of *Gluconobacter oxydans* for Improved Growth Rate and Growth Yield on Glucose by Elimination of Gluconate Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4369–4376 (2010)
22. Krystynowicz A., Czaja W., Bielecki S.: Biosynthesis and possibilities using of bacterial cellulose. *Żywn. Nauk. Technol. Ja*. **3**, 22–34 (1999)
23. Lin P.S., Calvar I.L., Catchmark J.M., Liu J.R., Demirci A., Cheng K.C.: Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose,* **20**, 2191–2219 (2013)
24. Lin X., Liu S., Xie G., Chen J., Li P., Chen J. Enhancement of 1,3-Dihydroxyacetone Production from *Gluconobacter oxydans* by Combined Mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1908–1917 (2016)
25. Majewska E., Białecka-Florjańczyk E.: Zielona chemia w przemyśle spożywczym. *Chem. Dyd. Ekol. Metrolog.* **1**, 21–27 (2010)
26. Mamlouk D., Gullo M.: Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Ind. J. Microbiol.* **53**, 377–384 (2013)
27. Marris C.: Public views on GMOs: deconstructing the myths. *EMBO reports,* **2**, 545–548 (2001)
28. Moosavi-Nasab M., Yousefi M.: Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste. *Iran J. Biotechnol*. 9, 94–101 (2011)
29. Saichana N., Matsushita K., Adachi O., Frébort I., Frébortová J.: Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1260–1271 (2015)
30. Sanchez S., Demain A.L.: Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *Microbiol. Biotechnol.* **1**, 283–319 (2008)
31. Santos S.M., Carbajo J.M., Gómez N., Quintana E., Ladero M., Sánchez A., Chinga-Carrasco G., Villar J.C.: Use of bacterial cellulose in degraded paper restoration Part II: application on real samples. *J. Mat. Scienc.* **51**, 1553–1561 (2016)
32. Siso G.: The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.* **57**, 1–11 (1996)
33. Slapšak N., Cleenwerck I., De Vos P., Trček J.: Gluconacetobacter maltaceti sp. nov., a novel vinegar producing acetic acid bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 17–21 (2013)
34. Soemphol W., Toyama H., Moonmangmee D., Adachi O., Matsushita K.: L-Sorbose Reductase and Its Transcriptional Regulator Involved in L-Sorbose Utilization of *Gluconobacter frateurii*. *J.Bacteriol.* **189**, 4800–4808 (2007)
35. Stasiak-Różańska L., Błażejak S.: Production of dihydroxyacetone from an aqueous solution of glycerol in the reaction catalyzed by an immobilized cell preparation of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. *Eur. Food. Res. Technol.* **235**, 1125–1132 (2012)
36. Ua-Arak T., Jakob F., Vogel R.F.: Characterization of growth and exopolysaccharide production of selected acetic acid bacteria in buckwheat sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* **239**, 103–112 (2016)
37. Ua-Arak T., Jakob F., Vogel R.F.I.: Influence of levan-producing acetic acid bacteria on buckwheat-sourdough breads. *Food Microbiol.* **65**, 95–104 (2017)
38. Valera M.J., Torija M.J., Mas A., Mateo E.: Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1349–1361 (2015)
39. Veeravalli S.S., Mathews A.P.: Exploitation of acid-tolerant microbial species for the utilization of low-cost whey in the production of acetic acid and propylene glycol. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-018-9174-3 (2018)
40. Wang B., Shao Y., Chen F.: Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 255–263 (2015)
41. Wunderlich S., Gatto K.A.: Consumer Perception of Genetically Modified Organisms and Sources of Information. *ASN*, **6**, 842–851 (2015)

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 403–404
http://www.pm.microbiology.pl



Autor: praca zbiorowa pod redakcją naukową **Jadwigi Baj**
Tytuł: **Mikrobiologia**
Redaktor PWN: **Krystyna Kruczyńska**
Projektant okładki: **Lidia Michalak-Mirońska**
Wydawnictwo naukowe PWN S.A.
Warszawa, 2018
ISBN 978-83-01-20036-7

Recenzowany podręcznik jest kolejną, najnowszą ofertą PWN z zakresu mikrobiologii. Wydana książka jest podręcznikiem akademickim przeznaczonym głównie dla studentów kierunków studiów biologicznych i biotechnologicznych Uniwersytetów, studentów wydziałów weterynaryjnych i zootechnicznych Uniwersytetów Przyrodniczych, a także studentów Uniwersytetów Medycznych. Prezentowany podręcznik jest najnowszym, uzupełnionym źródłem podstaw mikrobiologii wydanym przez PWN. Został on napisany przez 6 autorów specjalizujących się w różnych dziedzinach współczesnej mikrobiologii. Wszyscy Autorzy są mikrobiologami zatrudnionymi na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Ze względu na to, że mikrobiologia jest obecnie jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin biologii współczesnej, bardzo szybko przybywają nowe informacje zwiększające stan wiedzy na temat drobnoustrojów. Dlatego bardzo celowe jest ciągłe i częste uzupełniane zawartej w podręcznikach wiedzy. Z tego powodu intencja autorów, tj. zebranie najnowszych informacji z zakresu mikrobiologii oraz uzupełnienie dotychczasowej wiedzy było jak najbardziej wskazane i dość długo oczekiwane na rynku wydawniczym w kraju. Treści zawarte w podręczniku zostały podzielone na 10 rozdziałów. Sekwencja rozdziałów jest logiczna i zgodna z przyjętymi normami. Rozdział 2, poprzedzony wprowadzeniem, zapoznaje szczegółowo Czytelnika ze strukturą i funkcjonowaniem komórki bakteryjnej. Następne rozdziały dotyczą metabolizmu prokariotów (rozdział 3), ich wzrostu i cykli życiowych (rozdz. 4) oraz ich udziału w funkcjonowaniu biosfery (rozdz. 5). Następne 2 rozdziały dotyczą genetyki prokariotów, ich zmienności genetycznej i zjawiska horyzontalnego transferu genów (rozdz. 6 i 7). Rozdział 8 poświęcono wirusom prokariotycznym i innym nie komórkowym czynnikom infekcyjnym. Kolejne ostatnie dwa rozdziały należy uznać za najbardziej oryginalne i nowatorskie względem poprzednich wydań. Rozdział 9 poświęcony wykorzystaniu drobnoustrojów prokariotycznych w przemyśle i ochronie środowiska, co z pewnością ma przełożenie na podstawy mikrobiologiczne w biotechnologii w tym zakresie. W ostatnim (10) rozdziale zebrano i opisano zestaw stosowanej obecnie metodyki w badaniach mikrobiologicznych, bardzo specyficznej dla tej dyscypliny. Taki zbiór metod zawartych w podręczniku pozwoli studiującym na ich łatwiejsze opanowanie podczas zajęć praktycznych. Poznanie prawidłowych nawyków i powtarzalne stosowanie technik w mikrobiologii ma na pewno przełożenie na sukcesy w rozwiazywaniu problemów zawodowych w pracy mikrobiologa.

Jestem więc przekonany, że podręcznik z całą pewnością umożliwia poznanie podstawowych pojęć i zdobycie obszernej wiedzy z dziedziny mikrobiologii w zakresie umożliwiającym studiowanie tego przedmiotu w ramach mikrobiologii ogólnej. Podręcznik wyróżnia się dobrą szatą graficzną. Układ oraz dobór rycin i zdjęć są prawidłowe, a opisy do ilustracji tak dobrane, aby bezpośrednio rozwijać treści zawarte w tekście. Schematy i rysunki często po raz pierwszy powstały dla potrzeb tego podręcznika. Oceniany podręcznik zawiera dobrej jakości zdjęcia i pomysłowe schematy, odpowiednio dobrane do prezentowanych treści naukowych. Podkreślenie ważnych treści i definicji sprawia, że podręcznik może też pełnić funkcje encyklopedii w tematyce mikrobiologicznej dla bardzo szerokiej rzeszy czytelników zainteresowanych mikrobiologią. Jestem przekonany, że informacje zawarte w przedstawionym do recenzji podręczniku przyczynią się do zrozumienia problemów istotnych dla współczesnej mikrobiologii, pozwolą także na dowolne uzupełnianie wiedzy w tym zakresie.

Jacek Bielecki

Mamy przyjemność zapowiedzieć kolejny podręcznik objęty naszym patronatem, który ukaże się nakładem PWN 21 stycznia 2019 r.

Podręcznik **Biologiczne aspekty oczyszczania ścieków** prezentuje nowoczesne i konwencjonalne procesy biotechnologicznego oczyszczania ścieków organicznych, opartych na wykorzystaniu mikroorganizmów, jako katalizatorów reakcji biochemicznych do usuwania zanieczyszczeń organicznych oraz różnych form azotu nieorganicznego, fosforu oraz siarczanów. Autor podręcznika – Profesor Mieczysław Błaszczyk opisuje metody biologicznego oczyszczania ścieków bioprzemysłowych i wybranych ścieków pochodzących z różnych gałęzi przemysłu, utylizacji odpadów komunalnych i odcieków składowiskowych, a także skład jakościowy i ilościowy głównych taksonów tworzących wspólnoty mikroorganizmów w różnego typu bioreaktorach, uczestniczących w biologicznym oczyszczaniu ścieków. Podręcznik jest adresowany do studentów biologii, biotechnologii, ochrony środowiska, bioinżynierii środowiska.

POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 4, 405–410
http://www.pm.microbiology.pl

Nadchodzący rok przyniesie nowe wyzwania, oprócz rozpoczętego już projektu tłumaczenia publikacji na wersje anglojęzyczne planujemy dalszy rozwój czasopisma i w związku z tym powiększenie Redakcji naszego kwartalnika. Z dużą przyjemnością przedstawiamy nowych członków Redakcji. W kwietniu 2018 r. dr Agnieszka Sobolewska-Ruta z Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków przejęła obowiązki Sekretarza Redakcji. Dotychczasowy Sekretarz, dr Piotr Zaleski będzie kontynuował współpracę z *Postępami Mikrobiologii* w roli Redaktora działu biotechnologia. W listopadzie zespół redakcyjny został rozszerzony o nowych redaktorów działu. Do działu wirusologia dołączyła dr hab. Monika Adamczyk-Popławska i dr Agnieszka Kwiatek z Zakładu Wirusologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego. Ze względu na duże zainteresowanie Autorów utworzyliśmy również dział biotechnologia i mikrobiologia środowiskowa, którego redaktorem będzie dr Agata Goryluk-Salmonowicz z Samodzielnego Zakładu Biologii Mikroorganizmów, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego. Więcej informacji znajdą Państwo poniżej oraz w zakładce REDAKCJA na naszej stronie internetowej.

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW
06.12.2018

KONFERENCJA POD PATRONATEM PTM

Konferencja międzynarodowa:
8 Międzynarodowa Konferencja Weiglowska
Łódź, 26–28.06.2019

8th International Weigl Conference:
HUMAN WELFARE, CANCERS, SYSTEMIC AND INFECTIOUS DISEASES
Microorganisms in industrial and medical biotechnology
26-28.06.2019 Venue: Faculty of Management, University of Lodz

Konferencja organizowana jest przez
Instytut Biologii Medycznej PAN, Uniwersytet Łódzki
oraz Uniwersytet Medyczny w Łodzi

The planned Conference is the eighth conference to commemorate the outstanding Polish microbiologist Prof. Rudolf Weigl, the creator of the first effective vaccine against typhus. The conference is devoted to selected medical, microbiological and biotechnology issues. As part of the conference, thematic sessions will be devoted to (i) gastrointestinal diseases of various etiologies, (ii) skin diseases, (iii) and ophthalmologic cancerous and autoimmune diseases. In addition, there will be (iv) a molecular microbiology session focused on recent developments in microbial virulence, cell metabolism, signal transduction, bacterial biofilm studies and single cell analyzes. The last session (v) will be dedicated to microorganisms in industrial and medical biotechnology. The conference will be a unique platform for meetings and discussions for researchers dealing with the molecular basis of selected diseases, for microbiologists investigating these processes at the level of virulence factor, but also for clinicians involved in everyday diagnostics and treatment of diseases. The conference will also create a unique opportunity to familiarize participants of the session, including students and doctoral students, with different perspectives of research on the same processes, from the human body to pathogenic or saprophytic microorganisms and their mutual interactions.

http://grupamedica.pl/8th-international-weigl-conference-26-28-06-2019/
www.twitter/grupamedica ; https://web.facebook.com/8thweiglconferene/

KONFERENCJA POD PATRONATEM PTM

VII Konferencja Ogólnopolska:

Mikrobiologia Farmaceutyczna 2019

Gdańsk, 23–25 maja 2019 r.

Konferencja jest kontynuacją rozpoczętego w 2009 roku cyklu spotkań naukowo szkoleniowych, którego celem jest stworzenie Forum Specjalistów zainteresowanych mikrobiologią farmaceutyczną, służącego wymianie wiedzy, poglądów i doświadczeń w obszarach oceny i zapewnienia jakości, badań mikrobiologicznych oraz bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów leczniczych.

Na spotkaniach dążymy do inicjowania szeroko pojętej współpracy między mikrobiologami pracującymi głównie w przemyśle farmaceutycznym, ale też w spożywczym i kosmetycznym.

Patronat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego jest dla nas bardzo ważny, to PTM jest organizacją umożliwiającą współpracę, rozwój i kreowanie nowych rozwiązań w dziedzinie Mikrobiologii, a utworzenie sekcji Mikrobiologii Farmaceutycznej umożliwia ciągłe współdziałanie i rozwój Członków.

Podczas naszych konferencji promujemy przynależność do PTM i członkowie PTM już od poprzedniej VI konferencji Mikrobiologia Farmaceutyczna mają zniżkę 100 zł w opłacie konferencyjnej. W konferencjach bierze udział zwykle 80–100 osób z przedsiębiorstw farmaceutycznych, laboratoriów kontrolnych i uczelni.

Kontakt do Organizatora:
TRANSpharmacia, Pani Barbara Kawałko-Myślińska,
barbara.myslinska@transpharmacia.pl,
ul. Bacewiczówny 2/42, 02-786 Warszawa

Poniżej w punktach, w formie skrótowej przedstawiono omawiane sprawy na wirtualnych zebraniach Prezydium ZG PTM oraz spotkaniach z udziałem członków Prezydium.

1. W dniach 14–15 września 2018 roku w Poznaniu odbył się II Kongresu Towarzystw Naukowych pod tytułem „Rola towarzystw naukowych w rozwoju świadomości obywatelskiej i kulturowej". Kongres został zorganizowany przez Radę Towarzystw Naukowych PAN, Poznańskie Towarzystwo Przyjaciół Nauk, Polską Akademię Umiejętności oraz Towarzystwo Naukowe Płockie pod Patronatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Ministra Kultury i Dziedzictwa Narodowego.
Uczestniczyło w nim ponad 200 osób reprezentujących ponad 450-tysięczną społeczność członków towarzystw naukowych i stowarzyszeń naukowo-technicznych.
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów reprezentowała Pani prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć, Wiceprezes PTM.
Celem Kongresu było przedstawienie wkładu społecznego ruchu naukowego w rozwój świadomości narodowej, obywatelskiej i kulturowej w okresie od odzyskania niepodległości przez Polskę do chwili obecnej, a także dyskusja nad aktualnym miejscem społecznego ruchu naukowego w systemie nauki w Polsce. W ramach Kongresu były poruszane następujące zagadnienia:

- Rozwój i wkład towarzystw naukowych w kształtowanie świadomości narodowej i obywatelskiej na przestrzeni wieków.
- Ocena wkładu towarzystw naukowych w rozwój społeczeństwa obywatelskiego,
- Rozwój i wkład towarzystw naukowych w kształtowanie kultury polskiej w okresie od odzyskania niepodległości Polski.
- Wpływ towarzystw naukowych na rozwój nauki w Polsce w okresie od odzyskania niepodległości Polski.
- Wpływ towarzystw naukowych na rozwój społeczno-ekonomiczny i rozwój regionów w okresie od odzyskania niepodległości Polski.
- Wpływ towarzystw naukowych na rozwój techniki i gospodarki w Polsce i w poszczególnych regionach od odzyskania niepodległości Polski.
- Ocena wkładu towarzystw naukowych w upowszechnianie nauki w Polsce i rozwój nowoczesnych form upowszechniania nauki (festiwale nauki, pikniki naukowe).

- Aktualny system dofinansowania społecznego ruchu naukowego w Polsce ze środków przeznaczanych na naukę.
- Sytuacja prawna społecznego ruchu naukowego w aktualnym systemie nauki w Polsce.

W referatach i komunikatach, wygłoszonych na sesjach problemowych Kongresu, przedstawiono historię, dotychczasową działalność i dorobek poszczególnych towarzystw i stowarzyszeń naukowych i naukowo-zawodowych oraz stowarzyszeń naukowo-technicznych NOT. Podsumowaniem było przyjęcie Uchwały II Kongresu Towarzystw Naukowych, w której stwierdzono, że:

– towarzystwa naukowe i stowarzyszenia naukowo-techniczne odegrały doniosłą rolę w czasach zaborów w dziejach niepodległego Państwa Polskiego i są integralną częścią nauki polskiej, organizując społeczny ruch naukowy i budując społeczeństwo obywatelskie oraz podmiotami życia publicznego i ze względu na swoje znaczenie dla społeczeństwa powinny znaleźć należne miejsce w systemie prawnym w kraju.

– towarzystwa naukowe powinny być wspierane przez budżet państwa oraz budżety samorządowe ze względu na ich znaczenie dla rozwoju społeczeństwa. Kongres uznał, że przy stosunkowo niskim rozumieniu znaczenia nauki dla rozwoju naszego kraju należy wzmocnić rolę publikacji i innych działań odnoszących się do popularyzacji wiedzy i wyników badań. Podniesienie rangi takiej aktywności powinno następować nie tylko przez wsparcie materialne, ale i przez docenianie jej we wszystkich coraz bardziej sformalizowanych ocenach.

– uczestnicy Kongresu uznali, że bez zmiany polityki państwa w stosunku do społecznego ruchu naukowego spiętrzać się będą bariery rozwoju naukowego, kulturalnego, gospodarczego i społecznego Polski oraz zniweczony zostanie ogromny dorobek towarzystw naukowych.

2. W dniu 24.10.2018 r. odbyło się spotkanie Prezesa i Sekretarz PTM z Redaktorami Naczelnymi i Sekretarzami czasopism PM i PJM oraz z Panem Dawidem Ceculą Dyrektorem firmy Exeley Inc. wydającej *on-line* kwartalnik Polish Journal of Micorbiology https://www.exeley.com/journal/polish_journal_of_microbiology. Omówiono sprawy związane z usprawnieniem działania systemu Editorial Manager oraz współprace redakcji PJM z Exeley Inc. Ponadto rozpoczęto rozmowy nad włączeniem od 2019 r. czasopisma *Postępy Mikrobiologii* do procesu edytorskiego prowadzonego przez powyższą firmę wydawniczą, co powinno zaowocować zwiększeniem cytowalności i wartości współczynnika Impact Factor.

3. Rozpoczęliśmy, we współpracy z firmą tłumaczy z Lublina, proces tłumaczenia na język angielski artykułów przesłanych do numerów 3 i 4 z 2018 r. *Postępów Mikrobiologii.* Działalność ta jest możliwa, dzięki otrzymaniu dofinansowania z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach Działalności Upowszechniającej Naukę (Umowa nr 659/P-DUN/2018). Biorąc pod uwagę, że dofinansowanie na tłumaczenie otrzymamy także w przyszłym roku, planujemy publikować artykuły w obu językach – polskim i angielskim w zeszytach PM w 2019 r. Artykuły z PM w języku angielskim będą mogły być czytane i cytowane nie tylko przez polskich czytelników. Taka działalność również ma na celu zwiększenie cytowalności i wartości współczynnika Impact Factor.

4. Prezydium ZG PTM podjęło pozytywną decyzję w sprawie objęcia patronatem czasopisma „Zakażenia XXI wieku" – oficjalnego, recenzowanego czasopisma Polskiego Towarzystwa Zakażeń Szpitalnych. Patronat ma polegać na zamieszczeniu linku do czasopisma na stronie PTM, wsparciu merytorycznym czasopisma przez PTM oraz podawaniu propozycji artykułów. W zamian, czasopismo „Zakażenia XXI wieku" będzie informować o organizowanych przez PTM konferencjach i seminariach, w czasopiśmie oraz na stronie internetowej. **Uchwała nr 34–2018.**

5. Prezydium ZG PTM podjęło pozytywną decyzję w sprawie objęcia patronatem konferencji „8th International Weigl Conference", organizowanej przez Instytut Biologii Medycznej PAN, Uniwersytet Łódzki oraz Uniwersytet Medyczny w Łodzi, w terminie 26–28.06.2019 r., oraz poparcia wniosku Komitetu Organizacyjnego Konferencji o dofinansowanie konferencji przez FEMS (w przypadku przyznania środków przez FEMS, PTM również dofinansuje konferencję w kwocie 250 Euro). **Uchwała nr 35–2018.**

6. Prezydium ZG PTM podjęło pozytywną decyzję w sprawie objęcia patronatem VII Konferencji Mikrobiologia Farmaceutyczna organizowanej w Gdańsku w dniach 23–25 maja 2019 r. Bez kosztów PTM. **Uchwała nr 36–2018.**

7. Do Nagrody Naukowej im. prof. Edmunda Mikulaszka Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów zgłosiło się tylko 2 kandydatów. Komisja Konkursowej pod przewodnictwem Pani prof. dr hab. Stefanii Giedrys-Kalemby po przeprowadzeniu dyskusji drogą e-mailową, proponuje przyznać dwie równorzędne nagrody II stopnia, po 3.000 zł: mgr inż. biot. Pawłowi Kwiatkowskiemu za pracę: P. Kwiatkowski i wsp.: The effect of fennel essential oil in combination with antibiotics on *Staphylococcus aureus* isolated from carriers. Burns, 2017, 43: 1544-1551 (IF_{2017} – 2.134, MNISW – 25 pkt).
dr inż. Wojciechowi Smułek za pracę: W. Smułek i wsp.: *Sapindus* saponins' impact on hydrocarbon biodegradation by bacteria strains after short- and long-term contact with pollutant. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2016, 142: 207–213 (IF_{2016} – 3.887, MNISW – 35 pkt).
Prezydium Zarządu Głównego PTM podejmie w powyższej sprawie stosowną uchwałę.

8. Informujemy, że 3 Członków Wspierających PTM – firmy: HCS Europe-Hygiene & Cleaning Solutions, Ecolab Sp. z o.o. oraz Merck Sp.z o.o. uiściły już swoje składki członkowskie za 2018 rok, za co bardzo dziękujemy.

9. **Uchwałą nr 33–2018** Prezydium ZG PTM przyjęto do PTM siedmiu nowych Członków Zwyczajnych.

10. Dosyć opieszale posuwa się sprawa opracowania regulaminu wydatkowania i rozliczania funduszy, które zaplanowano przyznać Oddziałom Terenowym PTM w kwocie równoważnej 10% opłat członkowskich wnoszonych przez członków PTM z danego Oddziału. **Uchwałą ZG PTM nr 23–2018** z dnia 19.03.2018 r. powołana została 3 osobowa Komisja do opracowania tego regulaminu. W dniu 13.10.2018 r. Komisja przesłała do sekretariatu ZG PTM pierwszy projekt roboczy regulaminu. Ostateczny projekt regulaminu musi uzyskać aprobatę Księgowej PTM, Prezydium ZG PTM oraz całego ZG PTM. Oczekujemy na kolejne wersje projektu uwzględniające zgłaszane do Komisji uwagi. Jeżeli projekt nie uzyska wstępnych akceptacji, nie będzie poddany głosowaniu na dorocznym zebraniu ZG PTM planowanym w marcu w 2019 r. i środki nie będą mogły być udostępnione Oddziałom.

11. Przypominamy o 8 Kongresie Europejskich Mikrobiologów organizowanym przez FEMS 7–11 lipca 2019 r. w Glasgow, http://fems2019.org/. Termin składania wniosków przez młodych naukowców o wsparcie uczestnictwa w Kongresie – 15 stycznia 2019 r. Ostateczny termin nadsyłania abstraktów na Kongres, to również 15 stycznia 2019 r.

FEMS 2019

8th Congress of European Microbiologists

7-11 July 2019 | Glasgow, Scotland

12. Przypominamy terminy składania wniosków o granty FEMS: Research and Training Grants – 01.01.2019 r., Congress Attendance Grants – 15.01.2019 r.

13. Na dzień 5.12.2018 r. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów liczy 957 członków. Liczba członków PTM w Oddziałach Terenowych wynosi odpowiednio: OT Warszawa – 198, OT Kraków – 131, OT Katowice – 99, OT Bydgoszcz – 78, OT Poznań – 76, OT Szczecin – 66, OT Lublin – 62, OT Gdańsk – 57, OT Łódź – 47, OT Wrocław – 35, OT Białystok – 33, OT Olsztyn – 31, OT Kielce – 24, OT Puławy – 20.
Składki za rok 2017 r. **(2018 r.)** zapłaciła następująca liczba członków danego oddziału: OT Warszawa – 175 **(112)**, OT Kraków – 124 **(96)**, OT Katowice – 93 **(72)**, OT Bydgoszcz – 75 **(47)**, OT Poznań – 75 **(53)**, OT Szczecin – 62 **(39)**, OT Lublin – 60 **(46)**, OT Gdańsk – 53 **(39)**, OT Łódź – 45 **(30)**, OT Wrocław – 31 **(25)**, OT Olsztyn – 29 **(26)**, OT Białystok – 27 **(21)**, OT Kielce –19 **(15)**, OT Puławy –18 **(11)**.
Członkowie PTM, którzy nie opłacili jeszcze składki za 2018 r. proszeni są o pilne jej uzupełnienie.

W związku ze zbliżającymi się Świętami Bożego Narodzenia i Nowego Roku 2019, przekazujemy Państwu najserdeczniejsze życzenia zdrowych, pogodnych i szczęśliwych Świąt oraz wielu sukcesów, pomyślności i spokoju w nadchodzącym roku.

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

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

Członek Wspierający PTM – Złoty
od 27.03.2017 r.

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

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

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 07.06.2017 r.

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

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

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.

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

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.12.2017 r.

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

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.

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

SPIS TREŚCI

M. Danielewski, D. Ksiądzyna, A. Szeląg – Nieantybiotykowe zastosowania antybiotyków ... 301
M. Prygiel, K. Brodzik, A. Wiatrzyk, M. Główka, K. Woźnica, K. Wdowiak, U. Czajka, A. A. Zasada – Szczepionki przeciw zakażeniom rotawirusowym ... 313
A. Poniewierska-Baran, B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – Teoria zagrożenia oraz cząsteczki niebezpieczeństwa ... 328
B. Podgórska, D. Kędzia – Dwa oblicza bakterii *Staphylococcus epidermidis*, czyli od komensala do patogenu ... 338
B. Podgórska, D. Kędzia – *Staphylococcus epidermidis* jako czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych ... 348
D. Gmiter, G. Czerwonka, W. Kaca – Systemy sekrecji typu Vb oraz VI jako czynniki konkurencji bakterii Gram-ujemnych ... 360
Ł. P. Tymiński, Z. Znajewska, G. B. Dąbrowska – Charakterystyka i funkcje hydrofobin oraz ich wykorzystanie w przemyśle ... 374
K. Krasoń, M. Larska – Ryzyko wystąpienia chorób przenoszonych przez wektory owadzie u zwierząt w europie ... 385
L. Stasiak-Różańska, M. Kupiec – Przemysłowe zastosowanie dzikich i genetycznie zmodyfikowanych szczepów bakterii octowych ... 398

RECENZJE ... 403

KOMUNIKATY, INFORMACJE ... 405

CONTENTS

M. Danielewski, D. Ksiądzyna, A. Szeląg – Non-antibiotic use of antibiotics ... 301
M. Prygiel, K. Brodzik, A. Wiatrzyk, M. Główka, K. Woźnica, K. Wdowiak, U. Czajka, A. A. Zasada – Vaccines against rotavirus infection ... 313
A. Poniewierska-Baran, B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – Danger theory and damage-associated molecular patterns ... 328
B. Podgórska, D. Kędzia – From a commensal to a pathogen – two faces of *Staphylococcus epidermidis* ... 338
B. Podgórska, D. Kędzia – *Staphylococcus epidermidis* as a causative agent of healthcare-associated infections ... 348
D. Gmiter, G. Czerwonka, W. Kaca – Type Vb and VI secretion systems as competition agents of Gram-negative bacteria ... 360
Ł. P. Tymiński, Z. Znajewska, G. B. Dąbrowska – Characteristics and functions of hydrophobins and their use in industry ... 374
K. Krasoń, M. Larska – The risk of diseases transmitted by insect vectors in animals in europe ... 385
L. Stasiak-Różańska, M. Kupiec – Industrial applications of wild and genetically-modified strains of acetic acid bacteria ... 398

BOOKS REVIEWS ... 403

NEW REPORTS, INFORMATION ... 405