Kwartalnik
Tom 47
Zeszyt 3 • 2008

CODEN:
PMKMAV 47 (3)
2008

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), DANUTA DZIERŻANOWSKA (Centrum Zdrowia Dziecka),
EUGENIA GOSPODAREK (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy), JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski),
WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków), MAREK JAKÓBISIAK (Akademia Medyczna w Warszawie),
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),
ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki), ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski),
BOHDAN STAROŚCIAK (Akademia Medyczna w Warszawie), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JERZY HREBENDA (redaktor naczelny), JACEK BIELECKI (zastępca),
BOHDAN STAROŚCIAK (sekretarz), MARTA BRZÓSTKOWSKA (korekta tekstów angielskich)

Adresy redakcji

Redaktorzy:
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (0 22) 554 13 05/304, fax (0 22) 554 14 04
e-mail: j.hrebenda@biol.uw.edu.pl; jbielecki@biol.uw.edu.pl

Sekretarz
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (0 22) 628 08 22, (0 22) 621 13 51
e-mail: bohdan.starosciak@wum.edu.pl

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin,
tel./fax: (091) 46 616 51, 52, lub fax: (091) 46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci.pam.szczecin.pl

Stali recenzenci:

JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
JÓZEF KUR (Politechnika Gdańska), EUGENIUSZ MAŁAFIEJ (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki),
ANNA PRZONDO-MORDARSKA (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Index Copernicus ICV = 3,16 (2008)

Na okładce:

Koegzystencja grzybni *Paecilomyces* sp. (żółta w centrum) z kolonią *Bacillus* sp.
(w kształcie splątanego sznura) na płytce z agarem odżywczym.
Coexistence of *Paecilomyces* sp. (yellowish one in the centre) and *Bacillus* sp.
(rope-shaped) on an nutrient agar plate.
Fot. dr Jerzy Piątkowski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytet Wrocławski

Projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Nakład 1150 + 15 egz., Objętość 33 arkusze wyd., Papier offser 80 g

Skład i druk:
Zakład Wydawniczy *Letter Quality*, 01-216 Warszawa, Brylowska 35/38,
tel. 0 22 631 45 18, 0 607 217 879, e-mail: letter.quality@neostrada.pl

XXVI ZJAZD

POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

„DROBNOUSTROJE – WYZWANIA I NADZIEJE"

SZCZECIN, 4 – 7 WRZEŚNIA 2008

(w 60-lecie utworzenia Pomorskiej Akademii Medycznej)

***Organizatorzy*:**

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii
Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
70-111 Szczecin, ul. Powstańców Wlkp. 72
tel. (91) 466 16 52, fax. (91) 466 16 59
e-mail: mikrobio@sci.pam.szczecin.pl

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
Zarząd Główny
00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34

Fundacja „Centrum Mikrobiologii Klinicznej
00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34

***Redaktor numeru*:**

STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii
Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
70-111 Szczecin, ul. Powstańców Wlkp. 72
tel. (91) 466 16 52, fax. (91) 466 16 59
e-mail: kalemba@mp.pl

KOMITET NAUKOWY ZJAZDU:

PRZEWODNICZĄCA: Prof. dr hab. Waleria Hryniewicz

CZŁONKOWIE:
Prof. dr hab. Maria Bielecka
Prof. dr hab. Marian Binek
Prof. dr hab. Hanna Dahm
Prof. dr hab. Waldemar Dąbrowski
Prof. dr hab. Wiesław Deptuła
Prof. dr hab. Włodzimierz Doroszkiewicz
Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Prof. dr hab. Danuta Dzierżanowska
Prof. dr hab. Jan Fiedurek
Prof. dr hab. Antoni Furowicz
Prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba
Prof. dr hab. Eugenia Gospodarek
Prof. dr hab. Włodzimierz Grajek
Prof. dr hab. Piotr Heczko
Prof. dr hab. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka
Prof. dr hab. Józef Kur
Prof. dr hab. Anna Macura
Prof. dr hab. Gayane Martirosian
Prof. dr hab. Stefan Martyniuk
Dr hab. Jacek Międzobrodzki
Prof. dr hab. Anna Przondo-Mordarska
Prof. dr hab. Joanna Radziejewska-Lebrecht
Prof. dr hab. Antoni Różalski
Prof. dr hab. Elżbieta Samorek-Salamonowicz
Prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz
Prof. dr hab. Stanisława Tylewska-Wierzbanowska
Prof. dr hab. Stefan Tyski

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 163–169
http://www.pm.microbiology.pl

BIOTECHNOLOGICZNE NANOMATERIAŁY

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Stanisław Bielecki*, Halina Kalinowska

Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka, ul. B.Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, tel. (42) 631 34 42
* Autor korespondencyjny: e-mail: stanb@p.lodz.pl

1. Wprowadzenie. 2. Przykładowe nanomateriały, ich produkcja i zastosowanie. 3. Nanobiomateriały stosowane w medycynie. 4. Właściwości celulozy bakteryjnej. 5. Biosynteza celulozy bakteryjnej. 6. Modyfikacje celulozy bakteryjnej. 7. Podsumowanie

Biotechnological nanomaterials

Abstract: Nanomaterials have one or more dimensions in the range of 1 to 100 nm. Due to the greatly increased surface area they display very different characteristics from their large bulk forms which create new application opportunities. They have been important in materials science and in the field of medicine. Some nanomaterials, e.g. bacterial cellulose (BC), can be isolated from microbial sources. The most efficient BC producers are *G. xylinus* strains. BC and BC-based composites are excellent nanobiomaterials and have already been widely used in medicine and other areas.

1. Introduction. 2. Examples of nanomaterials, their manufacturing and applications. 3. Nanomaterials used in medicine. 4. Properties of bacterial cellulose. 5. Biosynthesis of bacterial cellulose. 6. Modifications of bacterial cellulose. 7. Summary

Słowa kluczowe: nanomateriały, celuloza bakteryjna
Key words: nanomaterials, bacterial cellulose

1. Wprowadzenie

Podstawową cechą odróżniającą nanomateriały od tradycyjnych materiałów są ich wymiary, z których co najmniej jeden mieści się w przedziale od 1 do 100 nm, a także związana z tym znacznie większa powierzchnia właściwa, czyli stosunek powierzchni do masy [37]. Dzięki tym cechom nanomateriały wykazują dużo większą reaktywność chemiczną, zaś oddziaływania pomiędzy wchodzącymi w ich skład atomami i innymi cząsteczkami są silniejsze. Na właściwości optyczne, magnetyczne i elektryczne tej grupy materiałów ogromny wpływ wywierają efekty kwantowe, czyli zjawiska fizyczne w mikro- i nanoskali. Nanomateriały znalazły szereg zastosowań praktycznych w produkcji materiałów kompozytowych, elektronice, chemii i medycynie. Ich wykorzystanie pozwala nie tylko podnieść odporność chemiczną i wytrzymałość mechaniczną wyrobów hutniczych i tworzyw sztucznych, ale również zwiększa skuteczność terapii przeciwnowotworowych i szybkość gojenia ran. Niektóre nanobiomateriały, takie jak np. polisacharydy i otrzymywane na drodze ich modyfikacji materiały kompozytowe, są otrzymywane z zastosowaniem biotechnologii. Ich przedstawicielem jest celuloza bakteryjna i jej pochodne.

2. Przykładowe nanomateriały, ich produkcja i zastosowanie

Do nanomateriałów należą m.in.: a) nanokrystaliczne związki nieorganiczne, głównie tlenki metali (np. dwutlenek tytanu, tlenek cynku) lub ich siarczki i selenki, b) związki metalo-organiczne, zawierające atomy metali koordynacyjnie związane z organicznymi ligandami, c) nanostruktury zbudowane wyłącznie z atomów węgla, np. nanorurki, nanodiamenty, d) materiały hybrydowe, będące zawiesiną nieorganicznych nanocząsteczek w organicznej matrycy polimeru lub zbudowane z nanocząsteczek organicznego związku, równomiernie rozproszonych w nieorganicznej matrycy, takiej jak np. krzemionka lub inny tego typu tlenek, e) nieorganiczne lub organiczne nanocząsteczki związane z matrycą o charakterze amfipatycznego kopolimeru, np. otrzymanego na bazie tlenku polietylenu lub polipropylenu, f) szkliste i przejrzyste żele otrzymane w wyniku suszenia dendrymerów (omówionych poniżej kulistych polimerów o średnicy do 5 nm), g) naturalne lub modyfikowane biomolekuły, otrzymywane na drodze hodowli (głównie) drobnoustrojów lub z zastosowaniem enzymów, np. peptydy, polisacharydy, polihydroksykwasy (np. polimleczan, polihydroksymaślan itp.).

Zastosowania nanomateriałów obejmują:

a) kontrolowany i ukierunkowany transport leków (np. środków stosowanych w terapii nowotworów wybiórczo do komórek rakowych) i substancji odżywczych,
b) ochronę wszelkiego typu ran przed infekcjami i przyspieszenie procesu ich gojenia oraz ułatwienie regeneracji tkanek,
c) otrzymywanie: sztucznych organów hybrydowych; inteligentnych opakowań; ekologicznych powłok, przeciwdziałających rozwojowi biofilmów; inteligentnych materiałów filtracyjnych (np. membran

lub adsorbentów), umożliwiających szybki i wysoce wybiórczy rozdział biomolekuł; inteligentnych powierzchni i matryc do unieruchamiania enzymów i receptorów; samoczyszczących się powierzchni; samoorganizujących się polimerów; molekularnych receptorów, umożliwiających kontakt pomiędzy komputerem a światem ożywionym, a także narzędzi tnących [23].

Dotychczas większość nanomateriałów otrzymuje się przy zastosowaniu metod chemicznych, fizycznych i fizykochemicznych. Nanotechnologie**,** takie jak np. fotolitografia, nakładanie monowarstwy atomów, techniki laserowe, synteza dendrymerów i nanorurek itp., wymagają stosowania wyspecjalizowanej aparatury i sterylnej czystości linii technologicznych.

Zastosowania niektórych nanomateriałów wymagają ich kontaktu z żywymi komórkami oraz tkankami i z tego względu muszą one spełniać wymogi stawiane biomateriałom. W zależności od zastosowania biomateriały albo muszą wykazywać wysoką adhezję do białek, albo wprost przeciwnie, powinny zapobiegać przywieraniu tych biopolimerów [2]. Wyznacznikiem tej cechy jest tzw. krytyczne naprężenie powierzchniowe (Critical Surface Tensions, CST), które w tym drugim przypadku powinno mieścić się w zakresie 20–30 mN/m. Ponadto, biomateriały muszą charakteryzować się biokompatybilnością (brakiem cytotoksyczności) oraz biofunkcjonalością (możliwością biologicznych, biofizycznych i biochemicznych oddziaływań z żywym organizmem) [30]. Nie mogą też wywoływać reakcji systemu immunologicznego i alergii, ani powodować zagrożenia nowotworami. Wszystkie te kryteria spełniają nanobiomateriały stosowane w medycynie.

3. Nanobiomateriały stosowane w medycynie

Do nanobiomateriałów stosowanych w medycynie należą: nanomuszelki (nanoshells), nanorurki węglowe, dendrymery, kwantowe punkciki (quantum dots), superparamagnetyczne nanocząsteczki, liposomy [19], nanocząsteczki o charakterze przeciwutleniaczy (np. tlenek trójwartościowego ceru) [16], a także niektóre biomolekuły, np. polipeptydy o charakterze kopolimerów [6] i polisacharydy [4], otrzymywane przy zastosowaniu biotechnologii.

Mianem nanomuszelek określa się nanoczasteczki zbudowane z krzemowego centrum, otoczonego cieniutką warstewką atomów złota, które absorbują i rozpraszają fale świetlne o określonej długości w zakresie widzialnym i bliskiej podczerwieni. Można do nich przyłączyć przeciwciała specyficzne wobec komórek rakowych (po uprzednim związaniu tych przeciwciał z glikolem polietylenowym), dzięki czemu po wprowadzeniu do organizmu (zastrzyk dożylny) kierują się wybiórczo do ich wnętrza. Naświetlanie falami o odpowiedniej długości, np. 800 nm, powoduje, że wnętrze komórek rakowych silnie się nagrzewa, co prowadzi do ich zniszczenia. W podobnym celu stosowane są nanorurki węglowe, które służą też do transportu DNA do wnętrza komórek rakowych. W celach transportowych używane są także dendrymery, czyli nanocząsteczki o kształcie kuli, do których rozgałęzionego jądra, zbudowanego np. z reszt kwasu akrylowego i etylenodiaminy, dołączone są silnie rozgałęzione łańcuchy, np. oligomery cukrów prostych. Ogromna ilość końców, do których można przyłączyć np. barwniki fluorescencyjne, związki rozpoznawane przez określone receptory, leki przeciwnowotworowe itp. pozwala na diagnostykę i niszczenie nowotworu. Nanopunkciki kwantowe, czyli zbudowane z półprzewodników (np. selenku kadmu pokrytego siarczkiem cynku, razem 10–50 atomów) nanokryształy o średnicy od 2 do 10 nm mogą być związane z różnymi matrycami, także z białkami lub kwasami nukleinowymi. Można obserwować je dzięki fluorescencji wzbudzonej falami UV. Jeśli są przyłączone do specyficznych przeciwciał, to mogą penetrować komórki rakowe, ułatwiając ich wykrycie. W podobnym celu wykorzystuje się superparamagnetyczne nanocząsteczki o średnicy poniżej 10 nm, zbudowane z tlenków żelaza, w tym magnetytu Fe_3O_4, które są doskonałym środkiem kontrastowym podczas badań z zastosowaniem rezonansu magnetycznego. Liposomy nie są właściwie nanomateriałami, gdyż średnica tych otoczonych dwuwarstwą lipidową pęcherzyków waha się od 90 do 150 nm, ale i tak zalicza się je do tej grupy substancji. Podobnie jak poprzednio omówione nanomateriały stanowią one doskonały środek do ukierunkowanego transportu substancji leczniczych.

Dzięki rozwojowi nanobiotechnologii niektóre nanomateriały są otrzymywane z zastosowaniem enzymów lub żywych komórek, najczęściej drobnoustrojów. Jednym z nanomateriałów pochodzenia mikrobiologicznego jest celuloza bakteryjna (BC). Jest ona jednym z wielu polisacharydów syntetyzowanych przez drobnoustroje. Polimery te są, generalnie rzecz biorąc, doskonałym przykładem gotowych do użycia nanobiomateriałów, których właściwości można jeszcze udoskonalić na drodze manipulacji genetycznych (na poziomie szczepu producenta), poprzez zastosowanie odpowiednich warunków podczas hodowli drobnoustroju albo na drodze modyfikacji chemicznych i/lub enzymatycznych polimeru uzyskanego na drodze hodowli.

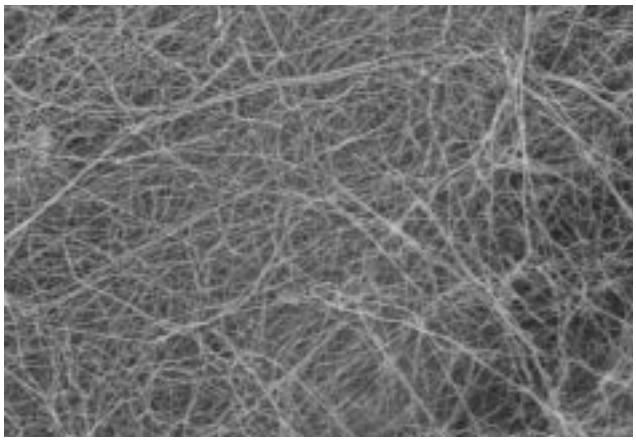
Najbardziej interesujące dla nanotechnologów są pozakomórkowe polisacharydy drobnoustrojów, które są wytwarzane w celach ochronnych przez wiele z nich, choć interesujące są również niektóre polisacharydy wchodzące w skład ścian komórkowych grzybów, takie jak β-glukany i chityna. Zaletą większości polisacha-

rydów mikrobiologicznych jest regularna, liniowa lub rozgałęziona struktura, zapewniająca przyjmowanie przez łańcuch uporządkowanej konformacji nawet w rozcieńczonych roztworach wodnych i/lub tworzenie stabilnych żeli lub liotropowych ciekłych kryształów [8]. Polisacharydy syntetyzowane przez drobnoustroje znalazły m.in. zastosowanie w medycynie i produkcji opakowań dla żywności.

4. Właściwości celulozy bakteryjnej

Celuloza bakteryjna jest nanomateriałem, gdyż jej nanofibryle, zbudowane z ułożonych współliniowo łańcuchów liniowego β-1,4-glukanu o stopniu polimeryzacji zbliżonym do 15000, mają przekrój poprzeczny 5–10 nm × 30–35 nm [4]. Tworzą one wstęgi o szerokości 70–150 nm (Rys. 1). Najwydajniejszymi producentami tego polisacharydu, który różni się od celulozy roślinnej mniejszym przekrojem poprzecznym włókien, wysokim stopniem krystaliczności (ponad 60%) i brakiem zanieczyszczeń takich jak hemicelulozy (heteropolisacharydy roślinne) i lignina (silnie usieciowany, roślinny polimer aromatyczny), są szczepy *Gluconoacetobacter xylinus* (poprzednio sklasyfikowane jako *Acetobacter xylinum*). Te Gram-ujemne, tlenowe bakterie syntetyzują białą, skóropodobną, silnie uwodnioną i elastyczną membranę na powierzchni ciekłych pożywek, tak by zapewnić komórkom dostęp tlenu. Każdy szczep *G. xylinus* i innych bakterii wytwarzających BC syntetyzuje membrany różniące się elastycznością, zdolnością wiązania wody, stopniem polimeryzacji (zwykle 2000–6000, ale w niektórych przypadkach nawet 16000 lub 20000) i stopniem krystaliczności. Na cechy te mają także silny wpływ warunki hodowli (stacjonarna lub wstrząsana), czas jej trwania i skład podłoża (źródło C i N, obecność innych polimerów, np. kolagenu, hemiceluloz). Finalne właściwości BC zależą też od metody jej oczyszczania z komórek bakterii i resztek podłoża oraz rodzaju ewentualnej modyfikacji po zakończeniu hodowli.

Nanofibrylarna budowa przestrzenna BC powoduje, że stanowi ona doskonały materiał opatrunkowy, ściśle dopasowujący się do wszelkiego typu ran [9]. Dokładnie oczyszczona, to jest pozbawiona jakichkolwiek resztek komórek i składników podłoża do hodowli, bakteryjna celuloza spełnia wszystkie warunki stawiane biomateriałom, tzn. jest biofunkcjonalna, biokompatybilna, nie powoduje alergii oraz nie jest mutagenna, czy teratogenna. Równie ważną zaletą BC jako opatrunku jest silne i trwałe uwodnienie oraz zdolność wiązania wydzielin z ran. Wilgotny opatrunek z BC dobrze chroni ranę przed zakażeniami z otoczenia, chłodzi i obniża odczucie bólu związanego z gojeniem się rany oraz nie przywiera do odradzającej



Rys. 1. Ułożenie przestrzenne nanowłókien celulozy bakteryjnej tworzących membranę (powiększenie 3300×) [4]

Rys. 2. Opatrunek z celulozy bakteryjnej (badania zespołu S. Bieleckiego)

się tkanki, dzięki czemu zmiana tego opatrunku nie uszkadza tej ostatniej i nie jest bolesna. Opatrunek ten może mieć dowolny kształt i wymiary (Rys. 2). Gojenie ran chronionych opatrunkami z BC jest szybsze i nie pozostawia blizn. Lecznicze działanie tych opatrunków można wzmocnić wiążąc z BC leki, substancje przyspieszające angiogenezę lub środki przeciwbakteryjne, takie jak np. nanosrebro, lizozym lub antybiotyki. Odpowiednio formując powierzchnię, na której podczas hodowli *G. xylinus* tworzy zwartą membranę można

Rys. 3. Rurki z celulozy bakteryjnej o średnicy wewnętrznej 5–7 mm uformowane podczas hodowli *G. xylinus* (badania własne zespołu S. Bieleckiego)

uzyskać rurki o dowolnej średnicy i długości (Rys. 3), które są doskonałymi implantami naczyń krwionośnych i mogą być też stosowane jako osłonki zerwanych włókien nerwowych, przyśpieszające ich regenerację. Odpowiednia obróbka po zakończeniu hodowli pozwala też uzyskać z BC materiał o charakterze chrząstki, który można stosować do sporządzania implantów, zastępujących chrząstki pochodzenia zwierzęcego.

Medyczne i pozamedyczne zastosowania BC przedstawiono w tabeli I [4].

5. Biosynteza celulozy bakteryjnej

Podstawowym problemem, napotykanym podczas produkcji celulozy bakteryjnej w dużej skali jest zbyt niska wydajność syntezy i pojawianie się mutantów Cel$^-$, czyli komórek *G. xylinus*, które nie są zdolne do biosyntezy tego glukanu, a jednocześnie wykorzystują składniki pokarmowe zawarte w podłożu do hodowli [4]. Mutacje te pojawiają się szczególnie często podczas hodowli wgłębnych z mieszaniem i napowietrzaniem i są znacznie rzadsze podczas hodowli stacjonarnych. Najbardziej prawdopodobną przyczyną tej różnicy jest stosunkowo wysokie stężenie tlenu w całej objętości napowietrzanego podłoża w fermentorze i dlatego komórki bakterii nie muszą syntetyzować maty celulozowej, zapewniającej wzrost na powierzchni międzyfazowej pożywka/powietrze, co ma miejsce podczas hodowli stacjonarnej. Jednakże, nadal nie ustalono, jaki jest dokładny mechanizm powstawania form Cel$^-$ i z tego powodu wiele uwagi poświęca się poznaniu mechanizmów regulacji biosyntezy BC na poziomie molekularnym. Nadal badany jest też wpływ innych parametrów hodowli na wydajność tego procesu. Ogromną zaletą szczepów *G. xylinus* jest dobry wzrost na różnorodnych źródłach węgla i azotu i dlatego aby obniżyć koszty produkcji BC hodowane są one często na pożywkach zawierających substancje odpadowe, takie jak np. glicerol, melasa, serwatka, odpady przetwórstwa warzyw itp. [1, 21, 35].

Poza typową optymalizacją składu podłóż do hodowli przeprowadzono również badania wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na tempo wzrostu *G. xylinus* i ilość wytwarzanej celulozy, które wykazały, że bakteria ta należy do drobnoustrojów barolotorancyjnych i potrafi zaadaptować się nawet do ciśnienia 100 MPa nie tracąc zdolności biosyntezy BC, choć ze wzrostem ciśnienia wydajność obniżała się [16]. Ponadto, szczepy *G. xylinus* potrafią syntetyzować BC rosnąc w jednym podłożu z bakteriami kwasu mlekowego [32]. Zauważono również, że szczepy *G. xylinus* wydajnie syntetyzują BC na podłożach stałych lub o charakterze żelu [11]. Z kolei szerokość wstęg BC, złożonych z nanofibryli udało się zmienić dodając do pożywki takie środki, jak np. chloramfenikol, które powodują wydłużenie komórek *G. xylinus*, a tym samym zmieniają wzajemne położenie porów, przez które wydzielane są poza komórkę łańcuchy celulozy [40].

Tabela I

Zastosowania celulozy bakteryjnej

Dziedzina	Zastosowanie
Medycyna	Materiał opatrunkowy (sztuczna skóra) przyspieszający gojenie wszelkiego typu ran, implanty naczyń, tchawicy itp., implanty dentystyczne
Kosmetyka	Stabilizator emulsji (kremy, toniki itp.), składnik sztucznych paznokci itp.
Przemysł tekstylny	Tkaniny, sztuczna skóra, materiały o wysokich zdolnościach absorpcyjnych, materiały do produkcji namiotów i sprzętu turystycznego
Papiernictwo	Papier o specjalnych właściwościach, naprawa starodruków, trwalsze banknoty i inne wyroby papiernicze
Ochrona środowiska	Ultrafiltracja wody, oczyszczanie ścieków, absorpcja zanieczyszczeń ropopochodnych, toksyn itp.
Produkcja żywności dietetycznej	Jadalna celuloza typu „nata de coco”
Akustyka	Membrany głośnikowe
Badania naukowe	Unieruchamianie białek, chromatografia, składnik podłóż do hodowli

Proces biosyntezy celulozy rozpoczyna się od przekształcenia glukozy w urydynodifosfoglukozę (UDP-glukozę), która jest donorem reszt β-D-glukopiranozy, dołączanych do rosnącego łańcucha β-glukanu. W procesie bierze udział co najmniej 8 białek, w tym 4 kluczowe enzymy, takie jak glukokinaza, fosfoglukomutaza, urydililotransferaza glukozo-1-fosforanowa i syntaza celulozowa. Białka te oraz sekwencje kodujących je genów są dobrze poznane [4, 18], ale nadal nie wiadomo do końca, w jaki sposób regulowana jest ich ekspresja, choć wiadomo, że stymulatorem biosyntezy BC jest cykliczny diguanozylomonofosforan (c-di-GMP) [14]. Jest to związek regulujący wiele różnych procesów komórkowych i uzależniający ich tempo od sygnałów płynących ze środowiska. Z kolei jego stężenie jest regulowane przez aktywność cyklazy diguanylowej (CDG), katalizującej konwersję 2 cząsteczek GTP do c-di-GMP oraz dwu enzymów przekształcających ten ostatni związek, odpowiednio, w liniowy di-GMP lub dwie cząsteczki GMP, takich jak fosfodiesterazy A1 i B (PDEA1 i PDEB). Geny tych trzech enzymów tworzą wspólny operon (pomimo przeciwstawnych aktywności), występujący w 3 różnych wariantach, których ekspresja dostarcza odpowiednio 80, 15 i 5% tych białek.

Ponieważ u wielu szczepów *G. xylinus* wydajność biosyntezy BC zwiększa się, jeśli podłoże zawiera dodatek etanolu, co ogólnie uważane jest za warunki stresowe, więc istnieje duże prawdopodobieństwo, że produkcja BC jest stymulowana przez czynnik sigma B (SigB), którego gen ulega zwiększonej ekspresji w różnych warunkach stresowych [26].

Całkowity materiał genetyczny stosowanych do biosyntezy celulozy szczepów *G. xylinus* nie został jak dotąd całkowicie zsekwencjonowany. W bazach danych zamieszczono jak dotąd 67 sekwencji nukleotydowych i 138 sekwencji białek różnych szczepów *G. xylinus*. Są to głównie sekwencje genów i białek związanych z biosyntezą celulozy. Dokonano już ekspresji większości tych genów w komórkach odpowiednich gospodarzy. Postąpiono tak m.in. z genami kodującymi podjednostki tworzące syntazę celulozową, które wchodzą w skład jednego operonu. Syntaza celulozowa jest białkiem oligomerycznym [4], występującym u wszystkich organizmów syntetyzujących celulozę (poza Gram-dodatnią bakterią *S. ventriculi*) i zbudowanym z 3 (AB, C i D) lub 4 podjednostek (A, B, C i D). Każda z tych podjednostek odgrywa inną rolę w procesie syntezy celulozy, np. podjednostka A jest glikozylotransferazą wydłużającą łańcuch glukanu, zaś podjednostki C i D są odpowiedzialne za jego transport poza komórkę. Synteza celulozy wymaga współdziałania syntazy celulozowej i białek enzymatycznych, kodowanych przez pewne geny umiejscowione poniżej i powyżej jej operonu, takich jak β-glukozydaza, β-1,4-glukanaza i białko CcpAX (cellulose complementing protein *Acetobacter xylinum*). Analiza porównawcza DNA poszczególnych szczepów *G. xylinus* wykazała wysoki stopień homologii i konserwatywność sekwencji genów szlaku biosyntezy celulozy, co jednak nie przekłada się na podobną produktywność tego polimeru u porównywanych szczepów.

Ten ostatni parametr udało się zwiększyć wprowadzając mutacje w obrębie genów niezwiązanych z operonem syntazy celulozowej, takich jak geny dehydrogenazy glukozy (przekształca glukozę w kwas glukonowy i ketoglukonowy) [34] oraz lewanosacharazy (katalizuje syntezę lewanu, czyli polimeru β-D-fruktofuranozy) [36], gdyż inaktywacja tych dwu enzymów blokuje procesy konkurujące z syntezą celulozy.

Na wydajność biosyntezy BC mają też wpływ ruchome elementy insercyjne (IS), wchodzące w skład plazmidowego DNA *G. xylinus* i zdolne do wbudowywania się do chromosomalnego DNA [39]. Ich obecność wiąże się z częstymi mutacjami, prowadzącymi do spadku wydajności biosyntezy BC. Szczepy *G. xylinus* zawierają zwykle system kilku plazmidów o różnej wielkości (od 16 do 300 kpz). Na ogół komórki Cel^+ i Cel^- różnią się profilem plazmidowym, ale należy podkreślić, że znaleziono również szczepy syntetyzujące BC i nie posiadające plazmidów.

Intensyfikacja badań dotyczących genetycznych uwarunkowań i regulacji procesu biosyntezy BC przez szczepy *G. xylinus* najprawdopodobniej pozwoli nie tylko zwiększyć jego wydajność, ale także zmodyfikować właściwości tego nanomateriału pod kątem określonych zastosowań.

6. Modyfikacje celulozy bakteryjnej

Nanokrystaliczna, uporządkowana struktura BC została wykorzystana w produkcji takich nanomateriałów, jak nanoprzewodniki zbudowane z nanokryształów TiO_2 [41] lub ZnO [5], związanych z nanomatrycą celulozową. Ponadto, na bazie BC otrzymywane są różnorodne materiały kompozytowe, zawierające: kolagen [38], chitozan [7], modyfikowaną skrobię [27], żywice fenolowe [25], alginian i poliwinylopirolidon [29], polifosforany [3], krzemionkę [22], celulozę roślinną [24] itp. Nieco innym typem kompozytu jest materiał zawierający wbudowane siateczki polipropylenowe, szczególnie przydatny jako materiał do zastosowań wewnętrznych.

Kompozyty zawierające BC są stosowane zarówno do celów medycznych (np. kompozyty z polifosforanem sodu i hydroksyapatytem, o wysokiej odporności mechanicznej zastosowano do regeneracji ubytków kości i leczenia zmian wywołanych osteoporozą), jak i jako komponenty zwiększające wytrzymałość

mechaniczną innych materiałów. Należy podkreślić, że otrzymywanie materiałów kompozytowych z celulozy bakteryjnej i roślinnej jest utrudnione ze względu na ich bardzo ograniczoną rozpuszczalność i wysoką hydrofilowość. Z tego względu rozpoczęto prace nad kompozytami zawierającymi moduły wiążące celulozę (cellulose binding module, CBM), pochodzące z cząsteczek celulaz. Moduły te są dobrze scharakteryzowane pod względem strukturalnym (pod tym względem podzielono je na 43 rodziny), co pozwoliło rozpocząć ich produkcję w skali laboratoryjnej [28]. Mogą one pełnić rolę linkerów, służących do wiązania z BC peptydów o działaniu biologicznym oraz białek.

Oprócz materiałów kompozytowych, ważną rolę zarówno w medycynie, jak i w produkcji opakowań, tworzyw sztucznych i klejów odgrywają różnorodne estry celulozy, które wytwarzane są również z BC [10], w tym karboksymetyloceluloza (CMC) [31], octan celulozy [20] i estry wyższych kwasów organicznych [13].

Liczną grupę pochodnych celulozy uzyskano na drodze jej utleniania nadjodanem sodu ($NaJO_4$), który powoduje rozerwanie wiązania C2-C3 w pierścieniu glukopiranozy i powstanie reaktywnych grup aldehydowych, umożliwiających kowalencyjne wiązanie związków zawierających wolne grupy aminowe, w tym białek, np. lizozymu. Z kolei działanie chlorkiem tozylu, dające pochodną tozylową, podstawioną przy C6 umożliwia wprowadzenie szeregu innych grup funkcyjnych do pierścieni glukozy [12]. Modyfikacje BC obejmują też jej kontrolowaną enzymatyczną hydrolizę [15].

7. Podsumowanie

Doskonałe właściwości BC sprzyjają poszukiwaniu nowych zastosowań tego nanobiomateriału oraz jego pochodnych. Przewidywane zastosowania celulozy bakteryjnej obejmują m.in. produkcję tzw. papieru elektronicznego, czyli lekkich, elastycznych i jednocześnie trwałych wyświetlaczy, zastępujących monitory komputerowe [33]. Związanie jonów metali i barwników zmieniających kolor pod wpływem napięcia elektrycznego wokół nanofibryli celulozy umożliwi przewodzenie prądu elektrycznego pomiędzy przezroczystymi elektrodami i odwracalne zmiany barwy pikseli. Powstanie w ten sposób ekran o wysokim kontraście, mogący zastąpić gazetę, mapę, tapetę itp.

Piśmiennictwo

1. Bae S.O., Shoda M.: Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **67**, 45–51 (2005)
2. Baier R.E.: Surface behaviour of biomaterials: the *teta surface* for biocompatibility. *J. Mater. Sci.: Mater. Med*. **17**, 1057–1062 (2006)
3. Barud H.S., Ribeiro C.A., Crespi M.S., Martines M.A.U., Dexpert-Ghys J., Marques R.F.C., Messaddeq Y., Ribeiro S.J.L.: Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite materials. *J. Therm. Anal. Calorim*. **87**, 815–818 (2007)
4. Bielecki S., Krystynowicz A., Turkiewicz M., Kalinowska H., Bacterial Cellulose (w) Biopolymers, vol. 5, Chapter 3, red. A. Steinbuchel, R.H. Marchessault, Wiley-VCh Verlag Gmbh & Co. KgaA, Weinheim, 2002, s. 37–90
5. Bin Hussein M.Z., Yahaya A.H.J., Ling P.L.C.: *Acetobacter xylenium* as a shape-directing agent for the formation of nano-, micro-sized zinc oxide. *J. Mater. Sci*. **40**, 6325–6328 (2005)
6. Chen T.-H.H., Bae Y., Furgeson D.Y.: Intelligent biosynthetic nanobiomaterials (IBNs) for hyperthermic gene delivery. *Pharm. Res*. **25**, 683–688 (2007)
7. Ciechańska D.: Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, **12**, 69–72 (2004)
8. Crescenzi V.: Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnol. Prog*. **11**, 251–259 (1995)
9. Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown M.R.: Microbial cellulose – the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, **27**, 145–151 (2006)
10. Edgar K.J.: Cellulose esters in drug delivery. *Cellulose*, **14**, 49–64 (2007)
11. Evans B.R., O'Neill H.M.: Effect of surface attachment on synthesis of bacterial cellulose. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **121–124**, 439–450 (2005)
12. Heinze T., Koschella A., Magdaleno-Maiza L., Ulrich A.S.: Nucleophilic displacement reactions on tosyl cellulose by chiral amines. *Polymer Bull*. **46**, 7–13 (2001)
13. Jandura P., Riedl B., Kokta B.V.: Thermal degradation behavior of cellulose fibers partially esterified with some long chain organic acids. *Polymer Degrad. Stability*, **70**, 387–394 (2000)
14. Jenal U., Malone J.: Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 385–407 (2006)
15. Josefsson P., Henriksson G., Wagberg L.: The physical action of cellulases revealed by a quartz crystal microbalance study using ultrathin cellulose films and pure cellulases. *Biomacromolecules*, **9**, 249–254 (2008)
16. Karakoti A.S., Monteiro-Riviere N.A., Aggrawal R., Davis J.P., Narayan R.J., Self W.T., McGinnis J., Seal S.: Nanoceria as antioxidant: synthesis and biomedical applications. *JOM*, **60**, 33–36 (2008)
17. Kato N., Sato T., Kato C., Yajima M., Sugiyama J., Kanda T., Mizuno M., Nozaki K., Yamanaka S., Amano Y.: Viability and cellulose synthesizing ability of *Gluconacetobacter xylinus* cells under high-hydrostatic pressure. *Extremophiles*, **11**, 693–698 (2007)
18. Kawano S., Tajima K., Uemori Y., Yamashita H., Erata T., Munekata M., Takai M.: Cloning of cellulose synthesis related genes from *Acetobacter xylinum* ATCC23769 and ATCC53582: comparison of cellulose synthetic ability between ATCC23769 and ATCC53582. *DNA Res*. **9**, 149–156 (2002)
19. Kelly Y., Kim M.A.: Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **3**, 103–110 (2007)
20. Kim D.-Y., Nishiyama Y., Kuga S.: Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose*, **9**, 361–367 (2002)
21. Krystynowicz A., Czaja W., Pomorski L., Kołodziejczyk M.: The evaluation of usefulness of microbial cellulose as a wound dressing material. Mededelingen van de Faculteit Land-

bouwwetenschappen Universiteit Gent, Gent, Belgium, **65**, 213–220 (2000)
22. Maeda H., Nakajima M., Hagaiwara T., Sawaguchi T., Yano S.: Bacterial cellulose/silica hybrid fabricated by mimicking biocomposites. *J. Mater. Sci*. **41**, 5646–5656 (2006)
23. Meyers M.A., Lin A.Y.M., Lin Y.S., Olevsky E.A., Georgalis S.: The cutting edge: sharp biological materials. *JOM*, **60**, 19–24 (2008)
24. Mormino R., Bungay H.: Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **62**, 503–506 (2003)
25. Nakagaito A.N., Iwamoto S., Yano H.: Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. *Appl. Phys. A*, **80**, 93–97 (2005)
26. Nies D.H.: Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria. *Arch. Microbiol*. **181**, 255–268 (2004)
27. Orts W.J., Shey J., Imam S.H., Glenn G.M., Guttman M.E., Revol J.-F.: Application of cellulose microfibrils in polymer nanocomposites. *J. Polymers Environment*, **13**, 301–306 (2005)
28. Pinto R., Carvalho J., Mota M., Gama M.: Large-scale production of cellulose-binding domains. Adsorption studies using CBD-FITC conjugates. *Cellulose*, **13**, 557–569 (2006)
29. Ramana K.V., Ganesan K., Singh L.: Pervaporation performance of a composite bacterial cellulose membrane: dehydration of binary aqueous-organic mixtures. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **22**, 547–552 (2006)
30. Rickert D., Lendlein A., Peters I., Moses M.A., Franke R.-P.: Biocompatibility testing of novel multifunctional polymeric biomaterials for tissue engineering applications in head and neck surgery: an overview. *Eur. Arch. Otorhinolarygol*. **263**, 215–222 (2006)
31. Ruzene D.S., Goncalves A.R., Teixeira J.A., Pessoa de Amorim M.T.: Carboxymethylcellulose obtained by etanol/water organosolv process under acid conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **136–140**, 573–582 (2007)
32. Seto A., Saito Y., Matsushige M., Kobayashi H., Sasaki Y., Tonouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F., Ueda K., Beppu T.: Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **73**, 915–921 (2006)
33. Shah J., Brown M.R. Jr: Towards electronic paper. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **66**, 352–355 (2005)
34. Shigematsu T., Takamine K., Kitazato M., Morita T., Naritomi T., Morimura S., Kida K.: Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (gdh)-deficient mutant of *Gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp. *J. Biosci. Bioeng*. **99**, 415–422 (2005)
35. Thompson D.N., Hamilton M.A.: Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **91–93**, 503–507 (2001)
36. Tonouchi N., Yanase H., Kojima Y., Tsuchida T., Yoshinaga F.: Increased cellulose production from sucrose with reduced levan accumulation by an *Acetobacter* strain harboring a recombinant plasmid. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **62**, 833–836 (1998)
37. Warren H.H.: Nanomaterials: nomenclature, novelty, and necessity. *JOM*, **56**, 13–18 (2004)
38. Wiegand C., Elsner P., Hipler U.-C., Klemm D.: Protease and ROS activities influenced by a composite of bacterial cellulose and collagen type I in vitro. *Cellulose*, **13**, 689–696 (2006)
39. Valla S., Coucheron D.H., Kjosbakken J.: *Acetobacter xylinum* contains several plasmids: evidence for their involvement in cellulose formation. *Arch. Microbiol*. **134**, 9–11 (1983)
40. Yamanaka S., Ishihara M., Sugiyama J.: Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, **7**, 213–225 (2000)
41. Zhang D., Qi L.: Synthesis of mesoporous titania networks consisting of anatase nanowires by templating of bacterial cellulose membranes. *Chem. Commun*. 2735–2737 (2005)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 171–175
http://www.pm.microbiology.pl

HIV/AIDS Z PERSPEKTYWY 25 LAT BADAŃ, STOSOWANEJ PROFILAKTYKI I TERAPII

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Andrzej Szkaradkiewicz

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
ul. Wieniawskiego 3, 61-712 Poznań, e-mail: szkaradkiewicza@poczta.onet.pl

1. Wprowadzenie. 2. Taksonomia HIV-1 i HIV-2, ich geograficzne występowanie i pochodzenie. 3. Genom HIV. 4. Profilaktyka. 5. Terapia

HIV/AIDS in the perspective of 25 years of studies, applied prophylaxis and therapy

Abstract: Over the last 25 years of studies on HIV/AIDS, the globally spreading HIV-1 and, present mainly in West Africa, HIV-2 have been widely recognized. Phylogenetic analyses indicate that the viruses have evolved as new pathogens most probably from simian retrolentiviruses (SIV). Thanks to the better knowledge of the pathogenesis of HIV infection, enormous progress has been made in field of anti-retroviral therapy. Nevertheless, until now no drug which would effectively eliminate HIV infection or a vaccine which would provide effective immunological anti-HIV barrier is available. It seems that further progress in anti-retroviral therapy might result from the silencing of viral genes mediated by RNA interference (RNAi) and from the development of new preparations capable of blocking host proteins indispensable in the HIV replication cycle, the so called HIV-dependency factors.

1. Introduction. 2. Taxonomy of HIV-1 and HIV-2, their geographical distribution and origin. 3. HIV genome. 4. Prophylaxis. 5. Therapy

Słowa kluczowe: HIV, retrowirusy, AIDS, szczepionka, leki antyretrowirusowe
Key words: HIV, retroviruses, AIDS, vaccine, antiretroviral drugs

1. Wprowadzenie

Ludzki wirus upośledzenia odporności – HIV (human immunodeficiency virus) został przez grupę Montagniera z Instytutu Pasteura w Paryżu po raz pierwszy przed 25 latami wyizolowany z hodowli limfocytów T, pochodzących od chorego z przewlekłym uogólnionym powiększeniem węzłów chłonnych i nazwany LAV (lymphadenopathy-associated virus) [1]. W 1984 roku zespół Gallo z Narodowego Instytutu Raka w Bethesdzie opisał nowy retrowirus, HTLV-III (human T-lymphotropic virus type III) i udokumentował jego identyczność z LAV [15]. W 1986 roku wyizolowano LAV-2/HTLV-IV od chorych w Afryce Zachodniej [7]. Nazewnictwo obu odkrytych wirusów zostało zmienione przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ICTV) w 1986 roku; wprowadzono nazwy HIV-1 i HIV-2, przyjęte i zalecane do stosowania przez Światową Organizację Zdrowia [8]. Wymienione wirusy wywołują u ludzi przewlekłe zakażenie i w konsekwencji – zespół nabytego upośledzenia odporności (AIDS – acquired immune deficiency syndrome). Pierwsze raporty kliniczne dotyczące AIDS pochodziły z USA i ukazały się w 1981 roku [4, 5, 20]. Aktualnie, zakażenia HIV i zachorowania na AIDS stwierdzono już we wszystkich krajach (z wyjątkiem niektórych państw wysp Pacyfiku), przy czym liczbę zakażonych HIV szacuje się obecnie na 60 mln osób. Pandemiczne rozprzestrzenianie się HIV/AIDS w świecie jest w ponad 75% następstwem ryzykownych kontaktów heteroseksualnych.

W okresie 25 lat badań nad HIV/AIDS, poznano w bardzo szerokim zakresie HIV-1 i HIV-2 oraz patogenezę ich zakażeń, co przyniosło olbrzymi postęp w terapii antyretrowirusowej. Jednak, nadal brak jest leku skutecznie eliminującego infekcję HIV oraz szczepionki, zapewniającej efektywną barierę immunologiczną anty-HIV. Wydaje się, że dalszy postęp w terapii anty-HIV może wnieść wyciszanie genów wirusa za pośrednictwem zjawiska interferencji RNA (RNAi) oraz zastosowanie nowych leków blokujących białka komórki gospodarza, które są niezbędne w cyklu replikacyjnym HIV, tzw. czynniki HIV-zależne (HDFs – HIV-dependency factors) [2, 21].

2. Taksonomia HIV-1 i HIV-2, ich geograficzne występowanie i pochodzenie

HIV-1 i HIV-2 należąc do kategorii wirusów z jednoniciowym RNA i odwróconą (rewersyjną) transkrypcją, wchodzą w skład podrodziny *Lentivirinae*, wyodrębnionej w rodzinie *Retroviridae*. W obecnej klasyfikacji wyróżnia się 3 filogenetyczne grupy HIV-1, grupę M (main – główną), O (outlier – oddzielną)

i N (non-M, non-O) [38]. Rozprzestrzeniające się globalnie zakażenia HIV-1 są w przeważającej większości wywoływane grupą M, którą tworzy 9 wyodrębnionych (w oparciu o stwierdzone 25–35% różnice w sekwencjach aminokwasów u produktów genu *env*) subtypów HIV-1, oznaczonych literami A-D, F-H, J i K. Występowanie wszystkich subtypów HIV-1 zidentyfikowano w Afryce Centralnej, przy czym największe zróżnicowanie genetyczne wirusów grupy M stwierdzono na terytorium Konga [41]. W Afryce Południowej, Etiopii i Indiach dominuje subtyp C, w Afryce Wschodniej przeważa subtyp A. W Europie Zachodniej i Centralnej, USA i Australii, a także w Chinach dominuje podtyp B [38, 43]. Jednocześnie, dobrze już udokumentowano, że pomiędzy różnymi subtypami HIV-1 w przebiegu równoczesnego zakażenia mogą zachodzić rekombinacje genetyczne, których następstwem jest powstawanie wirusowych rekombinantów o mozaikowej strukturze różnych podtypów ulegających rozprzestrzenianiu (CRFs – circulating recombinant forms). Opisano 16 CRFs, przy czym większość z nich pochodzi z Afryki [30]. Pogłębiające się zróżnicowanie genetyczne pomiędzy szczepami grupy M umożliwia powstanie nowych subtypów HIV-1. Grupa O wirusów charakteryzuje się około 50% różnicą w sekwencjach aminokwasów produktów genu *env* w porównaniu z grupą M. Zakażenia szczepami HIV-1 grupy O występują sporadycznie w Afryce Centralnej, głównie w Kamerunie [38]. Ponadto, tylko w Kamerunie stwierdzono pojedyncze przypadki infekcji wirusami grupy N [31]. Analiza filogenetyczna wszystkich 3 grup HIV-1 wskazuje na ich niezależne rodowody ewolucyjne, najprawdopodobniej wywodzące się z 3 gałęzi filogenetycznych retrolentiwirusów małpich, SIVcpz (simian immunodeficiency virus), których rezerwuarem są szympansy (cpz – chimpanzee; *Pan troglodytes*). Jednocześnie, na podstawie badań retrospektywnych wykazano, że najstarszy izolat HIV-1 należy do grupy M i pochodzi z 1959 roku od pacjenta z Konga. Szacuje się więc, że około 1930 roku w Afryce Centralnej, filogenetycznie odrębne szczepy SIVcpz zostały przeniesione z szympansów na człowieka prawdopodobnie poprzez zakażoną krew lub kontakty seksualne, co zapoczątkowało wyłonienie się 3 grup (M, O i N) HIV-1 [16, 40].

Z kolei, izolaty HIV-2 zostały dotychczas sklasyfikowane w obrębie 8 grup (A-H) [40]. Rozprzestrzenianie się HIV-2 jest geograficznie znacznie ograniczone; głównie występuje w Afryce Zachodniej. Analiza filogenetyczna wskazuje na wysoki stopień pokrewieństwa pomiędzy grupami HIV-2 i heterogennymi małpimi retrolentiwirusami izolowanymi od mangaby szarej (SIVsm; sm – sooty mangaby; *Cercocebus atys*) [26, 40]. Możliwym jest zatem, że wszystkie grupy HIV-2 wyłoniły się niezależnie w Afryce Zachodniej w następstwie zakażenia człowieka różnymi szczepami SIVsm.

3. Genom HIV

Materiał genetyczny HIV-1 i HIV-2, podobnie jak innych retrowirusów, stanowią dwie identyczne cząsteczki jednoniciowego RNA o dodatniej polarności, (+) ss RNA, długości około 9,3 kb, połączone wiązaniem wodorowym w pobliżu końców 5' [33]. Diploidalność genomu jest cechą wyjątkową w świecie wirusów i wydaje się mieć kluczową rolę w cyklu replikacyjnym retrowirusów, umożliwiając rekombinację oraz zmiany matrycy podczas tworzenia cząsteczek wirusowego DNA na drodze odwrotnej transkrypcji. Genom HIV, jak również HIV-2 zawiera 3 geny strukturalne oraz 6 genów pomocniczych (regulatorowych). Łącznie 9 genów HIV koduje jedynie 15 białek wirusowych [9]. Geny strukturalne odpowiedzialne są za syntezę białek niezbędnych do utworzenia pełnogenomowych cząstek wirusowych. Należą do nich [33]:

gag (group-specific antigen) – kodujący białko prekursorowi Gag (poliproteina – Pr, o m.cz. 55 kDa), z którego w trakcie procesu składania i dojrzewania powstaje końcowe białko matriksowe (MA), kapsydu(CA), nukleokapsydu (NC) i p6 oraz dwa peptydy, p1 i p2;

pol (polymerase) – kodujący białko prekursorowe Pol (początkowo pakowane w strukturę wirionu jako Gag Pol, Pr, o m.cz. 160 kDa), z którego w wyniku cięcia proteolitycznego powstają enzymy wirusa: proteza P, odwrotna transkryptaza (RT) z domeną RNazy-H (RH) oraz integraza (IN);

env (envelope) – kodujący prekursor (gp 160) dla glikolizowanych białek osłonki wiązania receptora (SU – surface glycoprotein, gp 120) i glikozylowanego białka transbłonowego fuzji błon (TM – transmembrane glycoprotein, gp 41).

Geny pomocnicze kodują białka regulatorowe, oddziaływując jako adaptery dla czynników komórkowych, modulując w ten sposób ekspresję materiału genetycznego i infekcyjność. Należą do nich [12, 13, 19, 27, 28, 33, 46]:

tat (transcriptional transactivator) – kodujący białko Tat, będące niezwykle silnym transaktywatorem ekspresji genów HIV. Podstawową jego funkcją jest wzmocnienie procesywnej aktywności polimerazy RNA II. Tat działa poprzez przyłączenie się przy końcu 5' do docelowej sekwencji TAR (transactivation response element) powstającego RNA HIV, co umożliwia produkcję pełnej długości transkryptów na matrycy prowirusowego DNA;

rev (regulator of expression of virion proteins) – kodujący białko Rev, będący regulatorem transportu cząsteczek mRNA z jądra do cytoplazmy, co zapewnia maksymalną produkcję wirionów. Rev działa poprzez przyłączenie się do docelowej sekwencji RRE (Rev response element) w RNA HIV (o pełnej

długości lub tylko po pojedynczym splicingu), kierując transkrypty na drogę eksportu do cytoplazmy, gdzie dochodzi do translacji późnych białek;

nef (negative regulatory factor) – kodujący wieloczynnościowe białko Nef, które moduluje ekspresję powierzchniowych cząsteczek CD4, jednocześnie nasila replikację, a także wywiera działanie antyapoptyczne w zakażonych komórkach;

vif (viral infectivity factor) – koduje zasadową fosfoproteinę Vif, która przyłączając się do enzymów komórkowych – deaminaz (APOBEC3), zapobiega ich włączeniu do nowo powstających wirionów i w ten sposób chroni przed inhibicją replikacji HIV w następnie zakażanych komórkach (tzw. paradygmat Vif/APOBEC3G). Delecja tego genu zmniejsza 25–100-krotnie zakaźność cząstek wirusowych;

vpr (viral protein R) – koduje białko R, odgrywające szczególną rolę w procesie transportu prowirusowego DNA (kompleksu preintegracyjnego, PIC) do jądra komórkowego, umożliwiając jego przeniesienie poprzez pory jądrowe. Ponadto, białko to indukuje zatrzymanie proliferujących komórek w fazie G2 cyklu podziałowego. Zwiększa to replikację wirusa, która jest najbardziej aktywna w tej fazie cyklu;

vpu (viral protein U) – występuje jedynie u HIV-1, kodując białko U, które zapewnia skuteczne wypączkowywanie wirionów z błony cytoplazmatycznej. Delecja tego genu powoduje akumulację cząstek wirusowych w komórce;

vpx (viral protein X) – występuje jedynie u HIV-2, kodując białko X, będące związane z funkcją produktu genu Vpr. Jednak, nie indukuje zatrzymania fazy G2 cyklu komórkowego. Delecja tego genu zmniejsza replikację HIV-2 w limfocytach T i makrofagach.

Poznanie funkcjonowania genów HIV jest rezultatem wieloletnich, intensywnych badań bardzo wielu międzynarodowych zespołów. Jednak, przełomowe są ostatnio prezentowane wyniki zespołu B r a s s a [2]. Dokumentują, że w cyklu replikacyjnym HIV konieczny jest udział 273 czynników komórkowych (HDFs), kooperujących z produktami genów wirusa. Aktywność funkcji białek HIV zależna jest więc od współdziałania bardzo wielu kofaktorów komórkowych, co ostatecznie umożliwia wirusowi efektywne zakażenie. Są to, m.in. [11, 18, 39, 42]: cyklofilina A (CyA) – biorąca udział w odpłaszczeniu HIV i promująca syntezę prowirusowego DNA; LEDGF/p75 (lens epithelium-derived growth factor – czynnik wzrostu pochodzący z nabłonka soczewki) – spełniający funkcję receptora dla cząstek PIC HIV-1, jednocześnie katalizującego integrację prowirusowego DNA z chromosomem gospodarza; cyklina T1 (CycT1) i cyklinozależna kinaza (Cdk9) – determinująca aktywność Tat; heterogenna jądrowa rybonukleoproteina A1 (hnRNP A1) i białko CRM-1 – będące kofaktorami Rev; kinaza Nak i regulator cytoszkieletu (Vav) – determinujące funkcję Nef; endofiliny i endosomalne kompleksy segregujące (ESCRT) – spełniające istotną rolę w procesie uwalniania cząstek wirusowych z komórki.

4. Profilaktyka

W okresie 25 lat rozwijającej się pandemii HIV/AIDS, problem swoistej, czynnej immunoprofilaktyki HIV stał się jednym z najważniejszych kierunków badawczych [10, 36]. Strategię konstrukcji immunogenów anty-HIV podporządkowano 2 zasadniczym kryteriom, jakie powinna spełniać szczepionka. Są to:

– indukcja długotrwałej optymalnej odpowiedzi humoralnej i komórkowej, wyrażona syntezą przeciwciał neutralizujących i aktywacją limfocytów T cytotoksycznych (CTL) o swoistości anty-HIV;
– brak potencjalnych własności superantygenu i krzyżowej reaktywności z autoantygenami.

Imponująca jest lista badanych preparatów, kandydatów na szczepionkę. W 1998 roku formalnie było zgłoszonych 117 preparatów, przy czym 30 z nich oceniono w próbach klinicznych I fazy [17]. Najszersze badania kliniczne (międzynarodowe fazy II) przeprowadzono ostatnio z użyciem preparatu opracowanego przez firmę Merck (Merck V520). Preparat ten skonstruowano, przy użyciu replikacyjnie defektywnego rekombinantu adenowirusa serotyp 5 (rAd5), będącego wektorem dla 3 syntetycznie otrzymanych genów HIV, tj. *gag*, *pol* i *nef* [23]. Jednak, uzyskiwane wyniki dokumentowały, że oceniany preparat Merck V520 nie tylko nie chronił przed zakażeniem HIV, ale co więcej mógł zwiększać podatność na zakażenie [25, 32]. Program badawczy został przerwany we wrześniu 2007 roku. Poważną przeszkodę dla efektywności szczepionki anty-HIV stanowi szybka „ucieczka" wirusa (warunkowana zmiennością antygenową) przed odpowiedzią przeciwciał neutralizujących oraz dysfunkcja limfocytów B, wcześnie rozwijająca się w następstwie zakażenia [14, 29]. W kontekście tych danych, możliwość uzyskania skutecznej szczepionki wydaje się niepewna. Ostatnio uzyskane wyniki wskazują, że efektywna odpowiedź anty-HIV limfocytów T CD8 (CTL) jest zależna od rozpoznania wysoko konserwatywnych determinant regionu p24 Gag wirusa [34, 35]. Dane te otwierają nowy okres badań nad szczepionką anty-HIV, przyporządkowywujący strategie jej konstrukcji pogłębionemu poznaniu swoistej wobec HIV reakcji immunologicznej, głównie odpowiedzi CTL [44]. Kierunkiem aktualnych działań są zatem poszukiwania nowych możliwości aktywacji CTL w połączeniach immunogenu z nieswoistym czynnikiem stymulującym (jak IL-12, IL-15).

Niezależnie od podejmowanych wysiłków w celu uzyskania skutecznej szczepionki, wdrażano działania zapobiegające zakażeniu HIV. W perspektywie 25 lat stosowanej profilaktyki HIV/AIDS, wyraźna jest ewolucja strategii postępowania [6]. Wczesne działania ukierunkowane na profilaktykę AIDS wdrażane były z tradycyjnej płaszczyzny zapobiegania i zwalczania chorób zakaźnych. Strategia ta, określana jako biomedyczna, wiązała się z wyodrębnieniem grup ryzyka (tzw. 4H), podejmowaniem prób unieszkodliwiania źródeł zakażenia (zakazy wjazdów nosicieli do niektórych krajów, przypadki przymusowej izolacji), ale także postępowaniem w celu przecięcia dróg szerzenia (stosowanie sprzętu jednorazowego użytku, wprowadzenie obowiązkowych testów serologicznych w krwiodawstwie, nowych metod sporządzania preparatów krwiopochodnych, zasad zapobiegania zakażenia HIV u pracowników służby zdrowia). W końcu lat 80-tych, wraz z pogłębianiem się wiedzy o HIV/AIDS, wprowadzono na szeroką skalę pojęcie zachowań ryzykownych oraz wdrożono różnorodne interwencje kształtowania i zmiany zachowań. Strategia ta określana jako behawioralna, uwzględniając skuteczne zastosowania biomedyczne zapobiegania HIV/AIDS, promowała postawy i umiejętności. Najnowsza strategia ochrony przed zakażeniem, realizowana od połowy lat 90-tych, jest ukierunkowana na zmniejszenie podatności. Określana jako strukturalna, polega na naukowym projektowaniu przedsięwzięć profilaktycznych, które służą zmniejszeniu podatności na podejmowanie ryzyka w obrębie różnych społeczności i kultur.

5. Terapia

Azydotymidyna (AZT, ZDV), będąca analogiem tymidyny, wdrożona do leczenia AIDS w 1986 roku, zapoczątkowała erę selektywnej terapii antyretrowirusowej [3, 45]. Aktualnie w leczeniu zakażeń HIV/AIDS znajduje zastosowanie pięć klas leków [37]. Są to: nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI): azydotymidyna (AZT, ZDV), didanozyna (ddI), zalcitabina (ddC), stawudyna (d4T), lamiwudyna (3TC), abakawir (ABC), tenofovir (TDF) i emtricitabina (FTC); nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NNRTI): newirapina, efawirenz i delawirydyna; inhibitory proteazy (PI): lopinawir, ritonawir, fosamprenawir, atazanawir, sakwinawir, nelfinawir, indinawir, amprenawir; inhibitory integrazy (INI): raltegrawir i inhibitory penetracji (EI): enfuwirtide. Istnieje kilka międzynarodowych zbiorów zaleceń, uaktualnionych w ostatnim czasie, zastosowania leczniczego zestawów ww. preparatów [22]. Jednak, leki te ograniczając replikację HIV, nie powodują jego eradykacji z zakażonego organizmu. Ponadto, istotnym problemem jest szybko rozwijająca się lekooporność. Dlatego, bardzo atrakcyjne są nowe koncepcje terapeutyczne wykorzystujące zjawisko interferencji RNA, jak również czynniki HIV-zależne (HDFs) [2, 21, 24]. Możliwa wydaje się być rekonstrukcja układu immunologicznego w AIDS za pośrednictwem limfocytów T z transfekowanym HIV-swoistym małym interferującym RNA (si RNA).

Piśmiennictwo

1. Barre-Sinoussi F., L. Montagnier i wsp.: Isolation of T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868–870 (1983) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
2. Brass A.L., Dykxhoorn D.M., Benita Y., Yan N., Engelman A., Xavier R.J., Lieberman J., Elledge S.J.: Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*, **319**, 921–926 (2008)
3. Brodt H.R., Kamps B.S., Gute P., Knupp B., Staszewski S., Helm E.B.: Changing incidence of AIDS – defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy. *AIDS*, **11**, 1731–1738 (1997)
4. Centers for Disease Control: Pneumocystis pneumonia. Los Angeles. *Morbid Mortal Week Rept.* **30**, 250–252 (1981)
5. Centers for Disease Control: Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men-New York City and California. *Morbid. Mortal. Week Rept.* **30**, 305–308 (1981)
6. Cianciara D.: Kierunki i rozwój profilaktyki HIV/AIDS. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 147–154 (2005)
7. Clavel F., L. Montagnier i wsp.: Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, **233**, 343–346 (1986) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
8. Coffin J., R. Weiss i wsp.: What to call the AIDS virus? *Nature*, **321**, 10 (1986) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
9. Cohen J.: HIV gets by with a lot of help from human host. *Science*, **319**, 143–144 (2008)
10. Emini E.A., Koff W.C.: AIDS/HIV. Developing an AIDS vaccine: need, uncertainty, hope. *Science*, **304**, 1913–1914 (2004)
11. Engelman A., Cherepanov P.: The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLOS Pathog.* **4**, 1–9 (2008)
12. Foster J.L., Garcia J.V.: Role of Nef in HIV-1 replication and pathogenesis. *Adv. Pharmacol.* **55**, 389–409 (2007)
13. Franca R., Spadari S., Maga G.: APOBEC deaminases as cellular antiviral factors: a novel natural host defense mechanism. *Med. Sci. Monit.* **12**, RA92–RA98 (2006)
14. Frost S.D.W., Trkola A., Günthard H.F., Richman D.D.: Antibody responses in primary HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS*, **3**: 45–51 (2008)
15. Gallo R.C., P.D. Markham i wsp.: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, **224**, 500–503 (1984) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
16. Gao F., B.H. Hahn i wsp.: Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, **397**, 436–441 (1999) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
17. Gellin B.: The Jordan Report: Accelerated, Development of Vaccines, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1998, 109–113.

18. Goff S.P.: Host factors exploited by retroviruses. *Nature Rev. Microbiol.* **5**, 253–263 (2007)
19. Goncalves J., Korin Y., Zack J., Gabuzda D.: Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J. Virol.* **70**, 8701–8709 (1996)
20. Gottlieb M.S., Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.A., Saxon A.: Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1425–1431 (1981)
21. Haasnoot J., Westerhout E.M., Berkhout B.: RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1435–1443 (2007)
22. Higersberger J., Pulik P., Horban A.: Różnice w aktualnych zaleceniach dotyczących leczenia antyretrowirusowego osób zakażonych HIV dotychczas nieleczonych. *Zakażenia*, **8**, 70–76 (2008)
23. Kostense S., J. Goudsmit i wsp.: Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector. *AIDS*, **18**, 1213–1216 (2004) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
24. Lecellier C.H., Dunoyer P., Arar K.: A cellular micro RNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, **308**, 557–560 (2005)
25. Ledford H.: HIV vaccine may raise risk. *Nature*, **450**, 325 (2007)
26. Lemey P., Pybus O.G., Wang B., Saksena NK., Salemi M., Vandamme A.M.: Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6588–6592 (2003)
27. Miller M.D., Furnet C.M., Bushman F.D.: Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* **71**, 5382–5390 (1997)
28. Morita E., Sundquist W.I.: Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 395–425 (2004)
29. Mullins J.I., Rolland M., Allen T.M.: Viral evolution and escape during primary human immunodeficiency virus-1 infection: implications for vaccine design. *Curr. Opin HIV AIDS*, **3**, 60–66 (2008)
30. Peeters M.: Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic (w) The HIV sequence compendium, red. C. Kuiken, B. Foley, B. Hahn, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 2000, s. 139–154
31. Roques P., Robertson D.L., Souquiere S., Apetrei C., Nerrienet E., Barre-Sinoussi F., Muller-Trutwin M., Simon F.: Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS*, **18**, 1371–1381 (2004)
32. Sekaly R.-P.: The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J. Exp. Med.* **205**, 7–12 (2008)
33. Sierra S., Kupfer B., Kaiser R.: Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* **34**, 233–244 (2005)
34. Streeck H., Lichterfeld M., Alter G.: Recognition of a defined region wittin p24 Gag by CD8+ T cells during primary HIV-1 infection in individuals expressing protective HLA class I alleles. *J. Virol.* **81**, 7725–7731 (2007)
35. Streeck H., van Bockel D., Kelleher A.: T-cell responses in primary HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS*, **3**, 52–59 (2008)
36. Szkaradkiewicz A.: Szczepionka przeciw zakażeniu HIV – aktualny stan badań, perspektywy. *Problemy HIV i AIDS*, **5**, Supl. 1, 24 (1999)
37. Szkaradkiewicz A.: Leki przeciwwirusowe – postęp badań, nowe możliwości terapeutyczne (w) Świat człowieka światem drobnoustrojów, red. W. Hryniewicz, Warszawa, 2007, s. 137–141
38. Thomson M.M., Pérez-Álvarez L., Nájera R.: Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 461–471 (2002)
39. Turlure F., Devroe E., Silver P.A., Engelman A.: Human cell proteins and human immunodeficiency virus DNA integration. *Front. Biosci.* **9**, 3187–3208 (2004)
40. Van Heuverswyn F., Peeters M.: The origins of HIV and implications for the global epidemic. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **9**, 338–346 (2007)
41. Vidal N., Peeters M., Mulanga-Kabeya C., Nzilambi N., Robertson D., Ilunga W., Sema H., Tshimanga K., Bongo B., Delaporte E.: Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J. Virol.* **74**, 10498–10507 (2000)
42. Votteler J., Wray V., Schubert U.: Role of cyclophilin A in HIV replication. *Future Virol.* **2**, 65–78 (2007)
43. Wang Y., Song A., Xu S., Li X., Chong H., Zhao C., Nie J., Zhong C.: Impact of HIV-1 genetic diversity in China on the measurement of viral load. *J. Med. Virol.* **80**, 1–8, 2008.
44. Watkins D.I.: Basic HIV vaccine development. *Top. HIV Med.* **16**, 7–8 (2008)
45. Yarchoan R., S. Broder i wsp.: Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS – related complex. *Lancet*, **1**, 575–580 (1986) (cytowana praca jest dziełem 18 autorów)
46. Yuankulov K., Bentley D.: Transcriptional control: Tat cofactors and transcriptional elongation. *Curr. Biol.* **8**, R447–R449 (1998)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 177–182
http://www.pm.microbiology.pl

DYLEMATY Z KONCEPCJĄ I DEFINICJĄ GATUNKU BAKTERYJNEGO

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Wanda Małek*, Sylwia Wdowiak-Wróbel, Michał Kalita, Małgorzata Szlachetka

Zakład Genetyki i Mikrobiologii UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, tel.: (81) 537 59 76
* Autor korespondencyjny: e-mail: wanda.malek@poczta.umcs.lublin.pl

1. Wstęp. 2. Techniki taksonomiczne wprowadzone do taksonomii w drugiej połowie XX wieku. 3. Nowe genomowe spojrzenie na definicję gatunku prokariotycznego. 4. Podsumowanie

The dilemma with bacterial species definition and concept

Abstract: The concept and definition of a bacterial species is a recurrent problem of taxonomists. It has a long history strongly connected with the development and implementation of new techniques, derived mainly from molecular biology into taxonomy. Presently, universally applied and accepted by prokaryotic taxonomists is the phylo-phenetic species concept. According to this concept, species is treated as a monophyletic, genomically coherent group of organisms sharing a high degree of phenotypic similarity compared to the strains from other related groups. Practically, bacterial species is considered to be a group of strains with a high degree of phenotypic similarity, 70% or higher degree of DNA hybridization, over 97% of 16S rRNA gene sequence identity and differs from organisms of other named species by one or a few phenotypic characteristics. Although this polyphasic species definition is practical and accepted by many bacteriologists, taxonomists are worting on more natural species concept oriented towards the genome. It is expected that the availability of large and still growing number of completely sequenced genomes will facilitate the development of a more natural species concept based on the gene content, gene order and the comparative sequence analysis of the genome conservative core genes. It has been found that 94% average nucleotide sequence identity (ANI) of the shared genes of two strains corresponded to the traditional 70% DNA-DNA reassociation used as a standard of the current bacterial species definition. At the 94% ANI cutoff, a species includes bacteria sharing only 65–90% of their genes as a result of strain residence in different ecological niches.

1. Introduction. 2. Techniques introduced into taxonomy in the latter half of the 20th century. 3. New, genomic look at the prokaryotic species definition. 4. Summary

Słowa kluczowe: definicja gatunku bakteryjnego, taksonomia
Key words: bacterial species definition, taxonomy

1. Wstęp

Obecnie w klasyfikacji organizmów prokariotycznych stosowana jest powszechnie taksonomia wielokierunkowa, która integruje informację z badań fenotypowych, genomowych i filogenetycznych [3, 26, 27, 30, 34, 37]. Od 1970 roku do wyznaczania gatunku bakteryjnego stosuje się metodę hybrydyzacji [35]. Zgodnie ze współczesną definicją, do gatunku bakteryjnego należą szczepy charakteryzujące się odpowiednio wysokim stopniem podobieństwa fenotypowego, przynajmniej jedną diagnostyczną cechą fenotypową, 50–70% lub wyższym stopniem hybrydyzacji DNA i ponad 97% stopniem identyczności sekwencji 16S rDNA [16, 30, 32, 35, 37]. Taksonomowie bakteryjni zgadzają się, że jakkolwiek dzisiaj stosowana definicja gatunku bakteryjnego nie jest doskonała to jest powszechnie akceptowana i spełnia główne cele taksonomii, tj. pozwala na szybką oraz solidną identyfikację i klasyfikację bakterii. Jest ona jednak krytykowana głównie ze względu na trudności w implementacji metody hybrydyzacji DNA-DNA do laboratoriów mikrobiologicznych. *Ad hoc* komitet do spraw taksonomii bakterii zachęca więc do reewaluacji obecnej definicji gatunku bakteryjnego poprzez wprowadzanie nowych metod pozwalających na bardziej naturalną klasyfikację organizmów [35]. W nurt ten doskonale włączyła się analiza sekwencji kompletnych genomów. Stanowią one źródło dodatkowych informacji o ewolucyjnym pokrewieństwie między bakteriami, ustalanym w oparciu o skład i kolejność genów, stopień podobieństwa sekwencji wspólnych genów rdzeniowych oraz charakterystyczne dla danego taksonu sekwencje podpisów, którymi mogą być insercje i delecje czyli tzw. indele [22, 23].

W prezentowanej pracy przedstawiamy przegląd metod stosowanych do oceny taksonomicznego pokrewieństwa między bakteriami oraz współczesną koncepcję i definicję gatunku bakteryjnego.

2. Techniki taksonomiczne wprowadzone do taksonomii w drugiej połowie XX wieku

Ważnym etapem w rozwoju współczesnej taksonomii bakteryjnej było wprowadzenie, pod koniec lat pięćdziesiątych XX wieku, analizy numerycznej cech biochemicznych i fizjologicznych dużej liczby szczepów

bakteryjnych [32]. Stało się to podstawą obiektywnego podziału bakterii na fenotypowo podobne, hierarchicznie ułożone grupy, poczynając od gatunku poprzez rodzaj, rodzinę aż do domeny. Okres ten zbiegł się z rozwojem chemotaksonomii, która wykorzystuje nowoczesne techniki biochemiczne, głównie chromatograficzne i elektroforetyczne do badania składu białek, cukrów i lipidów komórkowych [17, 30].

Poznanie struktury DNA i rozwój technik molekularnych na początku lat 60-tych XX wieku to początek nowej ery klasyfikacji organizmów opartej na analizie porównawczej ich genomów. Pierwszym molekularnym markerem taksonomicznym, wywodzącym się z analizy kwasów nukleinowych, była zawartość zasad G+C w DNA [26, 27, 34]. Bakterie wykazują duże zróżnicowanie w zawartości zasad G+C. Zawartość zasad G+C w genomach tych organizmów wynosi od 20 do 80 mol%. Empirycznie ustalono, że organizmy różniące się zawartością zasad G+C o więcej niż 10 mol% nie należą do tego samego rodzaju, a w obrębie gatunku różnice te nie są większe niż 5 mol%. Należy także podkreślić, że jakkolwiek różnice w zawartości zasad są istotne w różnicowaniu szczepów należących do różnych taksonów, to jednak podobna zawartość G+C niekoniecznie wskazuje na ich bliskie pokrewieństwo. Kryterium to może być stosowane jedynie negatywnie, ponieważ zawartość zasad nie koresponduje z sekwencją nukleotydów w DNA [30, 34].

Na początku lat 70-tych XX wieku opracowano pierwsze metody hybrydyzacji DNA, które pozwalają na określenie stopnia podobieństwa DNA bez uciekania się do jego sekwencjonowania [26, 27, 30, 34, 35, 39]. Obecnie technika ta jest niezbędna w wyznaczaniu granic gatunku bakteryjnego. W standardowych warunkach DNA dwóch szczepów bakteryjnych hybrydyzuje w stopniu zależnym od stopnia podobieństwa ich sekwencji nukleotydowych. Nie ma jednak liniowej korelacji między stopniem podobieństwa sekwencji DNA a stopniem hybrydyzacji. Ta ostatnia wartość odzwierciedla względny stopień podobieństwa między genomami. Mierzymy go na podstawie stopnia reasocjacji dwóch jednoniciowych cząsteczek DNA (RBR- Relative Binding Ratio) bądź też w oparciu o ΔT_m, tj. termiczną stabilność dupleksu DNA. Stopień hybrydyzacji określamy jako ilość heterologicznych dupleksów względem homodupleksów DNA. Heterodupleksy są mniej trwałe niż homodupleksy, a ΔT_m to różnica w temperaturze topnienia (T_m) hetero- i homodupleksów (T_m to temperatura, przy której 50% DNA ulega denaturacji) [34, 39].

Określając te dwa parametry dla znanych gatunków bakterii zarekomendowano stopień hybrydyzacji DNA wynoszący przynajmniej 70% i ΔT_m maksymalnie wynosząca 5°C jako parametry służące klasyfikacji bakterii do gatunku. Wartość RBR nie odzwierciedla stopnia podobieństwa sekwencji genomu na poziomie struktury pierwszorzędowej. Prokariotyczny DNA heterodupleksowy nie jest tworzony, jeśli DNA wykazuje mniej niż 80% komplementarnych sekwencji. Dwudziestoprocentowe różnice w identyczności sekwencji odnoszą się do stopnia hybrydyzacji od 0 do 100% [26, 34]. Analiza stopnia podobieństwa DNA metodą hybrydyzacji, niezbędna przy wyodrębnianiu nowego gatunku bakteryjnego, to technika wymagająca dużego nakładu pracy. Szczepy bada się parami, a uzyskana informacja nie może stanowić bazy danych do analizy innych organizmów prokariotycznych. Jednak korzyści tej metody przewyższają jej wady głównie dlatego, że stanowi ona ujednolicony i wymierny sposób wyznaczania granic gatunku bakteryjnego [3, 30].

Rys. 1. Współczesna praktyka ustalania pozycji taksonomicznej bakterii z wykorzystaniem trzech etapów badań (wg Gevers i wsp., 2006) DDH – hybrydyzacja DNA-DNA

Opracowanie technik sekwencjonowania kwasów nukleinowych w latach 70-tych XX wieku zaowocowało przełomem w badaniach nad filogenezą bakterii. Pierwszym markerem filogenetycznym wprowadzonym do taksonomii organizmów prokariotycznych została cząsteczka 16S rDNA [41]. O wyborze genu 16S rRNA do badania genealogii organizmów prokariotycznych zdecydowało: jego powszechne występowanie, odpowiednio duża ilość informacji genetycznej wynikająca z wielkości tej cząsteczki, konserwatywność związana z fundamentalną rolą rybosomów w biosyntezie białek oraz obecność regionów bardziej konserwatywnych (przydatnych we właściwym dopasowaniu porównywanych cząsteczek) jak i bardziej zmiennych (służących do pomiaru odległości ewolucyjnych), co umożliwia klasyfikację organizmów zarówno na poziomie gatunku jak i rodzaju [33]. Porównawcza analiza sekwencji 16S rDNA jest częścią wielokierunkowego podejścia przy opisie nowych gatunków i wyższych taksonów [35]. Szczepy wykazujące przynajmniej 95% identyczność sekwencji 16S

rDNA należą do tego samego rodzaju, a te o 97% i większym stopniu podobieństwa sekwencji 16S rDNA można zaklasyfikować do jednego gatunku bakteryjnego [3, 30, 33]. Nie należy jednak definiować gatunku jedynie w oparciu o porównawczą analizę sekwencji genu 16S rRNA. Metoda ta wykazuje zbyt niską rozdzielczość w przypadku organizmów bardzo blisko spokrewnionych, a więc należących do jednego gatunku. Dodatkowe korzyści z analizy sekwencji rDNA to możliwość badania różnorodności organizmów, których nie umiemy hodować oraz możliwość wyznaczania sond rRNA do monitorowania bakterii bez ich hodowania. Sekwencjonowanie genu 16S rRNA stało się obecnie standardem w systematyce bakterii i niemożliwe jest wyodrębnienie nowego gatunku bez oznaczenia sekwencji rRNA małej podjednostki rybosomu organizmów klasyfikowanych do tego taksonu [24]. Dostępność i ogromne zasoby baz danych zawierających sekwencje 16S rDNA z pewnością przyczyniają się do powszechnego stosowania tego molekularnego markera w badaniach porównawczych organizmów prokariotycznych. Od chwili opublikowania przez W o e s e i F o x [41] uniwersalnego drzewa życia, żaden inny gen nie był przebadany w celach filogenetycznych w takim stopniu jak gen kodujący 16S rRNA. W ostatnim czasie pojawiły się pewne zastrzeżenia co do taksonomii i filogenezy opartej wyłącznie na analizie genu kodującego 16S rRNA. Może to wynikać z faktu, że u niektórych bakterii stwierdzono więcej niż jedną kopię tego genu (od 1 do 15). Kopie te mogą różnić się między sobą sekwencją nukleotydową [1]. Należy jednak podkreślić, że u większości bakterii, u których stwierdzono kilka kopii genu 16S rRNA, sekwencje te są identyczne lub wykazują mniejsze niż 1% różnice w sekwencji nukleotydowej [1]. I tak wśród siedmiu w pełni zsekwencjonowanych genomów bakterii brodawkowych, trzy identyczne kopie genu 16S rRNA stwierdzono u *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* szczep 3841 [42], *Sinorhizobium meliloti* szczep 1021 [7] i *Rhizobium etli* CFN42 [15]. Dwie identyczne kopie zidentyfikowano u *Mesorhizobium loti* szczep MAFF303099 [20] oraz dwóch fotosyntetycznych szczepów rodzaju *Bradyrhizobium*, tj. BTAi1 i ORS278 [12]. Spośród w pełni zsekwencjonowanych genomów bakterii brodawkowych jedynie *Bradyrhizobium japonicum* szczep USDA110 posiada jedną kopię genu 16S rRNA [21]. Problem z filogenezą opartą na analizie tylko jednego markera genetycznego może wynikać również z horyzontalnego transferu genów (HGT) mogącego zachodzić na drodze koniugacji, transdukcji czy też transformacji [9, 14, 28]. Poza tym, filogeneza w oparciu o jeden gen niekoniecznie oddaje pokrewieństwo organizmów, jeśli różnicowanie genu i dywergencja gatunków nie zachodziły równolegle [29]. Dlatego w analizach filogenetycznych oprócz sekwencji genu 16S rRNA często wykorzystywane są także sekwencje innych genów, które są powszechnie wśród bakterii, nie ulegają transferowi horyzontalnemu, występują w genomie w jednej kopii i posiadają długość odpowiednią dla zapewnienia wystarczającej ilości informacji. Dodatkowo takie sekwencje powinny charakteryzować się zdolnością rozdzielczą pozwalającą na śledzenie ewolucji, tzn. nie powinny być ani zbyt konserwatywne ani zbyt zmienne [9].

Do alternatywnych markerów stosowanych w analizach filogenetycznych należą między innymi geny kodujące polimerazę RNA, gyrazę, syntazę ATP, białko szoku cieplnego DnaK- homolog Hsp70, syntetazę glutaminy czy uczestniczące w rekombinacji homologicznej białko RecA [2, 3, 8, 36]. Wykazano zgodność topologii drzewa filogenetycznego genu 16S rRNA z tymi opartymi na alternatywnych konserwatywnych cząsteczkach, co potwierdza wagę wszystkich tych molekularnych markerów w śledzeniu ewolucji organizmów prokariotycznych.

Badania taksonomiczne prowadzone są dzisiaj na trzech kolejno następujących po sobie poziomach, które można zobrazować w formie trójpoziomowej piramidy [10]. Każdy wyższy poziom dostarcza dodatkowej informacji i redukuje liczbę szczepów włączanych do dalszej, bardziej kosztownej i pracochłonnej analizy. Badania rozpoczynają się od metod przesiewowych obejmujących dużą liczbę szczepów. Na tym etapie stosowane są m. in. testy biochemiczne, fizjologiczne, analiza komórkowych kwasów tłuszczowych [37] oraz szeroki zakres metod typowania w oparciu o analizę DNA, włączając w to badanie polimorfizmu długości zamplifikowanych fragmentów restrykcyjnych [6], czy techniki PCR z zastosowaniem losowo dobranych starterów [40]. Uzyskane wyniki poddawane są analizie numerycznej, w wyniku czego szczepy grupowane są zgodnie z ich stopniem podobieństwa. Kolejny krok to analiza porównawcza sekwencji genu 16S rRNA szczepów reprezentujących poszczególne grupy fenotypowe czy też genomowe. Pozwala to na ustalenie pozycji filogenetycznej bakterii. Wyniki z tego etapu stanowią podstawę selekcji organizmów do trzeciego poziomu badań taksonomicznych, tj. oznaczania stopnia podobieństwa DNA-DNA metodą hybrydyzacji i ustalenie przynależności gatunkowej. 70% lub wyższy stopień reasocjacji DNA szczepu badanego, którego pozycja rodzajowa została określona na wcześniejszym etapie, z DNA szczepu referencyjnego należącego do tego samego rodzaju pozwala zaklasyfikować te bakterie do jednego gatunku genomowego [11, 15]. Jednak genomogatunkowi wyznaczonemu jedynie w oparciu o stopień hybrydyzacji DNA nie może być nadana dwuczłonowa nazwa gatunkowa. Może to nastąpić dopiero po określeniu charakterystycznych dla niego cech fenotypowych, które odróżniają dany

genomogatunek od innych znanych już gatunków bakterii. Niezbędność diagnostycznych cech fenotypowych w klasyfikacji organizmów do gatunku podkreśla wagę testów biochemicznych i fizjologicznych we współczesnej taksonomii organizmów prokariotycznych.

3. Nowe genomowe spojrzenie na definicję gatunku prokariotycznego

Z powodu ograniczeń, w funkcjonowaniu aktualnie obowiązującej definicji gatunku bakteryjnego, mikrobiolodzy poszukują nowych markerów służących do klasyfikacji organizmów na tym poziomie taksonomicznym. Duże nadzieje związane są z analizą genomów, których sekwencje zostały w pełni poznane [18]. Konstantinidis i Tiedje [23] porównali *in silico* skład genowy i sekwencje genów wspólnych 70-ciu w pełni zsekwencjonowanych genomów (kilka, kilkanaście z każdego gatunku) i wykazali, że 95% stopień identyczności genów wspólnych dwóch szczepów (ANI – Average Nucleotide Identity) koresponduje z 70% stopniem hybrydydzacji DNA-DNA przyjmowanym za złoty standard obecnej definicji gatunku bakteryjnego. Stąd wniosek, że szczepy z przynajmniej 95% ANI należą do tego samego gatunku. Szczepy takie są zróżnicowane pod względem składu genowego i mogą różnić się do 35% genów. Różnica ta zmniejsza się do 20% po odjęciu genów hipotetycznych, fagowych i elementów transpozycyjnych. Należy zauważyć, że 20% różnice w składzie funkcjonalnych genów, w przypadku genomów o wielkości 5 Mpz, dotyczą aż 1000 genów [22], które w dużym stopniu odpowiadają za fenotypowe i ekologiczne zróżnicowanie organizmów prokariotycznych. Umożliwiają one bakteriom należącym do tego samego gatunku zasiedlanie różnych nisz ekologicznych i są podstawą różnicowana ekotypów. Na fenotyp organizmów niewątpliwie ważny wpływ mają także różnice w poziomie ekspresji genów rdzeniowych, tj. wspólnych dla wszystkich szczepów danego gatunku, które stanowią od 65 do 90% całej puli genów, czyli pangenomu [23]. Metabolicznie bardziej wszechstronne są bakterie o większych genomach np. rodzaju *Burkholderia*, *E. coli*, które eksploatują większą liczbę nisz ekologicznych. Wykazują one także większe wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie genomowe niż gatunki o mniejszych genomach np. rodzajów *Streptococcus* czy *Staphylococcus* [22]. Można więc wnioskować, że nisze ekologiczne w istotny sposób wpływają na ewolucję organizmów i kształtują ich fenotyp. Ekologia organizmów może być jednym z elementów definicji gatunku bakteryjnego. Niektórzy badacze uważają, że szczepy o ANI powyżej 98% zamieszkujące różne nisze ekologiczne można zaliczyć do różnych gatunków, jak to jest np. w przypadku oportunistycznego patogenu *Burkholderia pseudomallei* żyjącego również w stanie wolnym i obligatoryjnego patogenu *Burkholderia mallei*, który prawdopodobnie powstał z tego pierwszego w wyniku redukcji genomu o 1.7Mpz [5, 22].

Analizując pełne sekwencje genomowe 20 szczepów *E. coli – Shigella*, których ANI jest większa niż 95% wykazano, że ich sekwencje unikalne to –15 Mpz, czyli około 13.000 tzw. genów adaptatywnych (pomocniczych), specyficznych dla poszczególnych szczepów, podczas gdy całkowita liczba sekwencji rdzeniowych w tych genomach wynosi 2.5 Mpz, czyli około połowy genomu *E. coli* o wielkości 5.1 Mpz [22]. Każdy dodatkowo zsekwencjonowany genom dostarcza nowych unikalnych genów zwłaszcza, gdy ANI tego szczepu względem pozostałych genomów danego gatunku jest mniejsza niż 98–99% lub gdy szczep zamieszkuje inną niż pozostałe bakterie niszę ekologiczną. Wyniki te podkreślają ogromną różnorodność genomową gatunku bakteryjnego. Można nawet przypuszczać, że całkowity rezerwuar genowy gatunku jest matematycznie nieskończony [22].

Pełne sekwencje genomowe, które oferują rozdzielczość na każdym poziomie taksonomicznym mogą być wykorzystywane jako referencyjne standardy przy ewaluacji i kalibracji nowych technik taksonomicznych. MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) jest jedną z metod, która cieszy się rosnącą popularnością w badaniu wewnątrzgatunkowego zróżnicowania bakterii [9, 13, 19]. Technika ta oparta jest na łącznej analizie 5–7 genów metabolizmu podstawowego. Konstantinidis, Ramette i Tiedje [22] przeprowadzili pilotażową ocenę techniki MLSA i porównali filogenezę opartą na kompletnych genomach z filogenezą opartą na MLSA siedmiu genów metabolizmu podstawowego siedmiu gatunków bakterii rodzaju *Burkholderia*. Niezależnie od kombinacji użytych genów obie filogenezy były zgodne, co w pełni uzasadnia stosowanie MLSA w badaniach taksonomicznych.

4. Podsumowanie

Koncepcja i definicja gatunku bakteryjnego to odwieczny problem bakteriologów a treść tych pojęć ulega zmianom wraz z rozwojem technologicznym i wprowadzaniem nowych metod do badań taksonomicznych. Poprzez określenie „koncepcja gatunku" rozumiemy teoretyczne podstawy pozwalające zrozumieć, co to jest gatunek i jak on powstaje. Definicja gatunku to zasady, którymi kierujemy się by wyznaczyć gatunek. Te dwa pojęcia wzajemnie się zazębiają. Lepsza koncepcja to także lepsza definicja gatunku. Według obecnej dość powszechnie akceptowanej przez mikrobiologów koncepcji, gatunek to monofiletyczne, genomowo spójne grono organizmów o wyso-

kim stopniu podobieństwa fentypowego, które różni się od osobników należących do innych pokrewnych gatunków pod względem jednej lub kilku cech fenotypowych [4, 5, 30, 35]. Dwie siły, tj. selekcja i rekombinacja spajają organizmy należące do takiego grona [4, 5, 25, 38]. Potężną siłą jest periodyczna selekcja, która w sposób powtarzający się resetuje genetyczną różnorodność organizmów do zera. Siłą spajającą gatunek jest również rekombinacja, która zachodzi częściej w obrębie gatunku niż między gatunkami [25, 38]. Ta różnica w stopniu rekombinacji jest siłą utrzymującą gatunek. Dzisiaj dysponujemy zbyt małą ilością informacji genomowych, aby ocenić wagę selekcji i rekombinacji i wprowadzić te kryteria do koncepcji gatunku bakteryjnego. Nie umiemy wiarygodnie ocenić częstości tych procesów i ich wpływu na ewolucję organizmów prokariotycznych.

Obecnie znamy około 5000 gatunków bakteryjnych. Jest to mała liczba, jeśli uwzględni się długie, bo liczące 3.8 miliarda lat istnienie tych organizmów na Ziemi, duży stopień ich zróżnicowania oraz obecność we wszystkich ekosystemach. Dzisiejsza definicja częściowo wyjaśnia tę małą liczbę nazwanych gatunków prokariotycznych. Klasyfikacja bakterii do gatunku wymaga bowiem charakterystyki fenotypowej oraz oznaczenia stopnia hybrydyzacji DNA-DNA, a więc hodowli bakterii w postaci czystych kultur bakteryjnych. Należy pamiętać, że umiemy hodować zaledwie 1% spośród wszystkich organizmów prokariotycznych. Stosowana w taksonomii od lat 80-tych XX w. analiza sekwencji 16S rDNA pozwala klasyfikować organizmy od poziomu domeny aż do rodzaju. Brak jej jednak rozdzielczości poniżej tego ostatniego poziomu. Genomika oferuje nowy wgląd do wewnątrzgatunkowej różnorodności organizmów i stwarza szansę na opracowanie nowej koncepcji i definicji gatunku bakteryjnego ściślej opartej na ewolucji organizmów. Obecnie, ze względu na zbyt małą liczbę w pełni zsekwencjonowanych i przeanalizowanych genomów, przedwcześnie jest zmieniać koncepcję i definicję gatunku bateryjnego na bardziej naturalną, tj. ściślej związaną z historią ewolucyjną organizmów. Podpisów charakterystycznych dla gatunku należy szukać nie tylko w różnicach sekwencji nukleotydowych, ale także w tzw. indelach, tj. insercjach i delecjach powodujących nabycie lub utratę specyficznych dróg metabolicznych oraz w różnicach poziomu ekspresji genów. Prawdopodobnie będzie to możliwe już w bliskiej przyszłości ze względu na szybki wzrost informacji genomowej.

Należy jednak pamiętać, że dobra koncepcja i definicja gatunku bakteryjnego powinna być akceptowana i stosowana przez wszystkich mikrobiologów także tych, którzy stosują ją na co dzień w laboratoriach diagnostycznych.

Piśmiennictwo

1. Acinas S.G., Marcelino L.A., Klepac-Ceraj V., Polz M.F.J.: Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J. Bacteriol.* **186**, 2629–2635 (2004)
2. Christensen H., Kuhnert P., Olsen J.E., Bisgaard M.: Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atp*D, *inf*B and *rpo*B and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1601–1609 (2004)
3. Coenye T., Gevers D., Van de Peer Y., Vandamme P., Swings J.: Towards a prakaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev.* **29,** 147–167 (2005)
4. Cohan F.M.: What are bacterial species? *Ann. Rev. Microbiol.* **56**, 457–487 (2002)
5. Cohan F.M.: Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philosophical Trans. R. Soc. B*, **361**, 1985–1996 (2006)
6. de Vos P., Zabeau M. i wsp.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407–4414 (1995) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
7. Galibert F., Batut J. i wsp.: The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, **293**, 668–672 (2001) (cytowana praca jest dziełem 56 autorów)
8. Gaunt M.W., Turner S.L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S.A., Young J.P.: Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 2037–2048 (2001)
9. Gevers D., Coenye T.: Phylogenetic and genomic analysis. (w) ASM Manual of Environmental Microbiology. red. J.L. Garland, S. O'Connell. ASM Press, 2005
10. Gevers D., Swings J. i wsp.: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 733–739 (2005) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
11. Gevers D., Dawyndt P., Vandamme P., Willems A., Vancanneyt M., Swings J., De Vos P.: Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **361**, 1911–1916 (2006)
12. Giraud E., Sadowsky M. i wsp.: Legumes symbioses: Absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, **316**, 1307–1312 (2007) (cytowana praca jest dziełem 34 autorów)
13. Godoy D., Randle G., Simpson A.J., Aanensen D.M., Pitt T.L., Kinoshita R., Spratt B.G.: Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2068–2079 (2003)
14. Gogarten J.P., Doolittle W.F., Lawrence J.G.: Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 2226–2238 (2002)
15. González V., Dávila G. i wsp.: The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3834–3839 (2006) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
16. Goodfellow M., Manfio G.P., Chun J.: Towards a practical species concept for cultivable bacteria. (w): Species: The units of biodiversity. red. M.F. Claridge, H.A. Dawah, M.R. Wilson, Chapman & Hall, London, 1997, s. 25–29
17. Goodfellow M., O'Donnell A.G.: Roots of bacterial systematics. (w) Handbook of New Bacterial Systematics. red. M. Goodfellow, A.G. O'Donnell, Academic Press, Harcourt Brace & Co. Publ., London, 1993, s. 3–54
18. Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M.: DNA-DNA hybridization values

and their relationship to whole-genome sequence similarities**.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1–11 (2007)
19. Hanage W. P., Fraser C., Spratt B. G.: Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Phil. Trans. R. Soc. B,* **361**, 1917–1927 (2006)
20. Kaneko T., Tabata S. i wsp.: Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**, 331–338 (2000) (cytowana praca jest dziełem 24 autorów)
21. Kaneko T., Tabata S. i wsp.: Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* **9**, 189–197 (2002) (cytowana praca jest dziełem 17 autorów)
22. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M.: Towards a genome-based taxonomy for Prokaryotes. *J. Bacteriol.* **187**, 6258–6264 (2005)
23. Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M.: The bacterial species definition in the genomic era. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **361**, 1929–1940 (2006)
24. Lilburn T.G., Garrity G.M.: Exploring prokaryotic taxonomy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 7–13 (20 04)
25. Majewski J., Zawadzki P., Pickerill P., Cohan F.M., Dowson C.G.: Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation. *J. Bacteriol.* **182**, 1016–1023 (2000)
26. Małek W., Wdowiak S.: Współczesna systematyka bakterii. *Post. Mikrobiol.* **35**, 119– 137 (1996)
27. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Święcicka I., Studzińska B.: W poszukiwaniu koncepcji gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* **44**, 323–328 (2005)
28. Ochman H., Lerat E., Daubin V.: Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6595–6599 (2005)
29. Rafiński J.: Badanie przebiegu filogenezy. (w) Zarys mechanizmów ewolucji. red. H. Krzanowska, A. Łomnicki, PWN, Warszawa, 2002, s. 295–334
30. Rossello-Mora R., Amann R.: The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 39–67 (2001)
31. Santos S.R., Ochman H.: Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ. Microbiol.* **6**, 754–759 (2004)
32. Sneath P.H.A., Sokal R.R.: Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco, 1973
33. Stackebrandt E., Goebel B. M.: Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **44**, 846–849 (1994)
34. Stackebrandt E., Liesack W.: Nucleic Acids and Classification. (w) Handbook of New Bacterial Systematics. red. M. Goodfellow, A.G. O'Donnell, Academic Press, Harcourt Brace & Co. Publ. London, 1993, s. 151–194
35. Stackebrandt E., Whitman W.B. i wsp.: Report of the ad hoc committee for the re-ewaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1043–1047 (2002) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
36. Stępkowski T., Czaplińska M., Miedzinska K., Moulin L.: The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 483–494 (2003)
37. Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J.: Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407–438 (1996)
38. Vulic M., Dionisio F., Taddei F., Radman M.: Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9763–9767 (1997)
39. Wayne L. G., Brenner D. J., i wsp.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **37**, 463–464 (1987) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
40. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531–6535 (1990)
41. Woese C.R., Fox G.E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088–5090 (1977)
42. Young J.P.W., Parkhill J. i wsp.: The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* **7**, R34 (2006) (cytowana praca jest dziełem 32 autorów)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 183–189
http://www.pm.microbiology.pl

ORGANIZACJA KLASTERÓW GENÓW BIOSYNTEZY CZĘŚCI RDZENIOWEJ LPS U WYBRANYCH BAKTERII Z RODZINY *ENTEROBACTERIACEAE*

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Marek Kwinkowski*, Kamil Zawadzki, Michał Zarzycki, Wiesław Kaca

Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii
Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczego Jana Kochanowskiego
w Kielcach, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce, tel. (41) 349 63 07
* Autor korespondencyjny: e-mail: mkwinkow@ujk.kielce.pl

1. Wstęp. 2. Analiza porównawcza genów biosyntezy części rdzeniowej LPS u *Enterobacteriaceae*. 2.1. Klaster genów *waa*. 2.1.1. Lokalizacja i charakterystyka klastera genów *waa*. 2.1.2. Operony *waaA* i *gmhD*. 2.1.3. Operon *waaQ*. 3. Operon *pbgPE* i podstawienie LPS 4-aminoarabinozą. 4. Podstawianie heptoz fosfoetanoloaminą. 5. Geny biosyntezy części rdzeniowej LPS u *Proteus mirabilis*. 6. Podsumowanie

Genetic organization of the core lipopolysaccharide gene clusters of selected bacteria of the *Enterobacteriaceae* family

Abstract: The core part of the lipopolysaccharide (LPS) has a very conservative structure. Genes coding for enzymes responsible for the biosynthesis of the core are grouped in the *waa* cluster. Several genes which encode proteins for attachment of phosphoethanoloamine and 4-aminoarabinose are found in another part of the genome. In this paper, a comparative analysis of the amino-acid sequence homology of proteins involved in the core biosynthesis is presented. We show that these proteins may be classified into two groups. The first comprises the proteins which are encoded by genes from the *waaQ* operon, while the second one contains the conserved proteins connected with the inner core biosynthesis. It has been also shown that genes encoding the second group of proteins have a distinguished localization in the genomes of the analyzed *Enterobacteriaceae* strains. These genes are localized in the outer part of the *waa* cluster (*waaA* and *gmhD* operons) but can be located also outside the cluster (*pmr*/*pbg* operon and the *lpt* gene encoding the phosphoethanoloamine transferase in *P. mirabilis*).

1. Introduction. 2. Comparative analysis of core lipopolysaccharide biosynthesis genes in *Enterobacteriaceae*. 2.1. *Waa* gene cluster. 2.1.1. Localization and characteristics of the *waa* gene cluster. 2.1.2. *WaaA* and *gmhD* operons. 2.1.3. *WaaQ* operon. 3. *PbgPE* operon and substitution of LPS with 4-aminoarabinose. 4. Substitution of heptoses with phosphoethanoloamine. 5. *Proteus mirabilis* genes involved in core lipopolysaccharide biosynthesis 6. Concluding remarks

Słowa kluczowe: lipopolisacharyd, rdzeń, geny *waa*
Key words: core, lipopolysaccharide, *waa* genes

1. Wstęp

Część rdzeniowa lipopolisacharydu (LPS) bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* wykazuje wysoki stopień konserwatyzmu strukturalnego. Zbudowana jest ona z dwóch części: rdzenia wewnętrznego – bardziej konserwatywnego i zwykle zawierającego kwas 2-keto-3-deoksyoktonowy (Kdo) oraz heptozy (najczęściej L,D-heptozy rzadziej D,D-heptozy) oraz zewnętrznego, bardziej zróżnicowanego zawierającego heksozy, heksozaminy czy kwasy uronowe [10]. U wielu bakterii Gram-ujemnych opisano jej kompletną strukturę chemiczną [6, 10, 13] a także zidentyfikowano geny sterujące jej syntezą [3, 6, 8, 10, 11]. Geny te są zgrupowane w formie klastera *waa*. Pozostałe geny, kodujące m.in. białka odpowiedzialne za dołączanie do oligosacharydu rdzeniowego dodatkowych podstawników takich jak fosfoetanoloamina lub reszty 4-aminoarabinozy [1, 2, 9, 12, 14] mogą występować w innych rejonach genomu.

Postęp w sekwencjonowaniu kompletnych genomów bakteryjnych umożliwił dostęp do genów scharakteryzowanych w bazach danych a związanych z biosyntezą lipopolisacharydów. Dzięki temu jest możliwa bioinformatyczna analiza porównawcza homologii sekwencji aminokwasowych białek zaangażowanych w biosyntezę fragmentu rdzeniowego LPS oraz organizacji ich genów w obrębie operonów i klasterów. Ze względu na stabilną pozycję w genomie, dobrym modelem analitycznym są tu geny biosyntezy części rdzeniowej LPS u *Enterobacteriaceae*. Ze względu na lokalizację, ale także i funkcję, geny te można podzielić na dwie grupy:

– geny należące do klastera *waa* kodujące przede wszystkim glikozylotransferazy oraz białka odpowiedzialne za syntezę ich substratów,
– geny związane z dołączaniem dodatkowych podstawników oligosacharydu rdzeniowego takich jak 4-aminoarabinoza (geny *pmr*/*pbg*) czy fosfoetanoloamina, znajdujące się poza klasterem *waa*.

2. Analiza porównawcza genów biosyntezy części rdzeniowej LPS u *Enterobacteriaceae*

Geny biosyntezy części rdzeniowej LPS analizowane były w oparciu o dostępne w bazach danych sekwencje genomów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Geny odpowiedzialne za biosyntezę i podstawienie lipidu A lub Kdo przez reszty 4-aminoarabinozy zidentyfikowano w oparciu o opis funkcji genów *pbg* u *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* [1, 2], a następnie przeprowadzono analizę porównawczą sekwencji obecnych w genomach *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* i *Serratia proteamaculans*.

Geny odpowiedzialne za podstawienie heptozy fosfoetanoloaminą zidentyfikowano w oparciu o opis funkcji genów *lpt* i ich analogów u *Haemophilus somnus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* oraz *Haemophilus influenzae* [9, 12, 14] a następnie przeprowadzono analizę porównawczą tych genów z sekwencją obecną w genomie *Proteus mirabilis.*

Do analiz bioinformatycznych wykorzystano bazy NCBI: GenBank, Genome, Blink, oraz program BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), a także bazy dostępne na stronie Instytutu Sangera (http://www.sanger.ac.uk/) i bazę PEDANT (http://pedant.gsf.de). W analizie homologii sekwencji korzystano z programu ClustalW.

2.1. Klaster genów *waa*

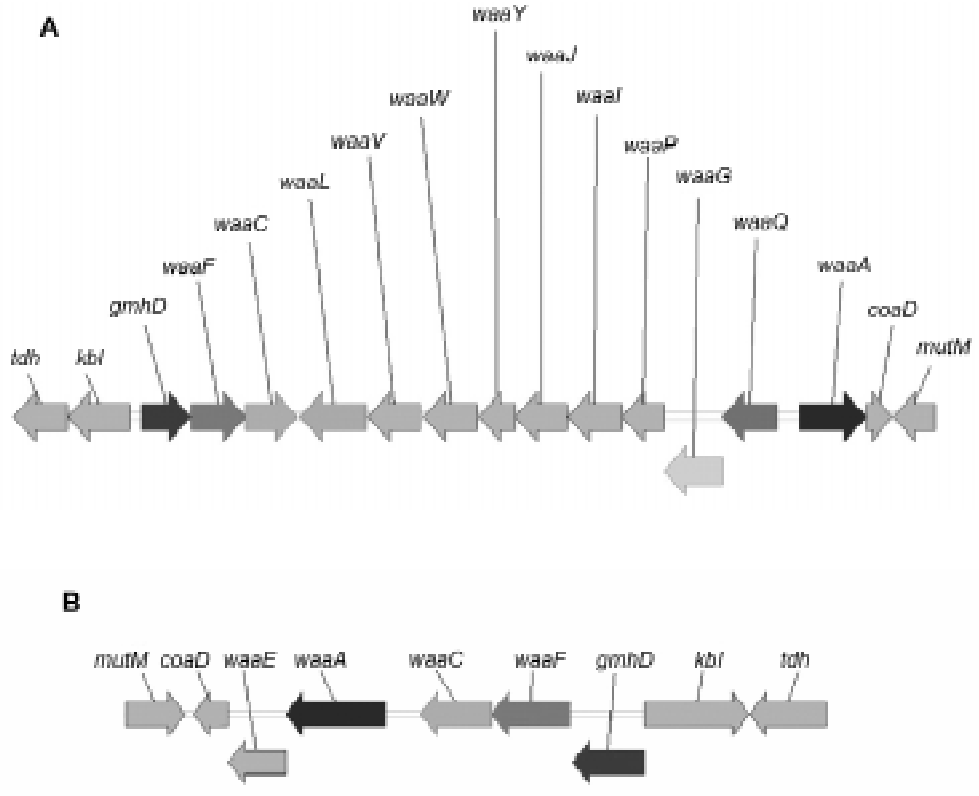
Klaster *waa* jest podstawowym elementem sytemu genów niezbędnych do prawidłowej syntezy części rdzeniowej LPS. Jest zbudowany z trzech operonów odpowiedzialnych za syntezę różnych fragmentów tego rejonu LPS (rys. 1A). Operony te to:

- zewnętrzne – *waaA* odpowiedzialny za przyłączanie Kdo do lipidu A i *gmhD* związany z biosyntezą rdzenia wewnętrznego a zwłaszcza części zawierającej heptozy,
- wewnętrzny – *waaQ* odpowiedzialny za dołączanie heksoz.

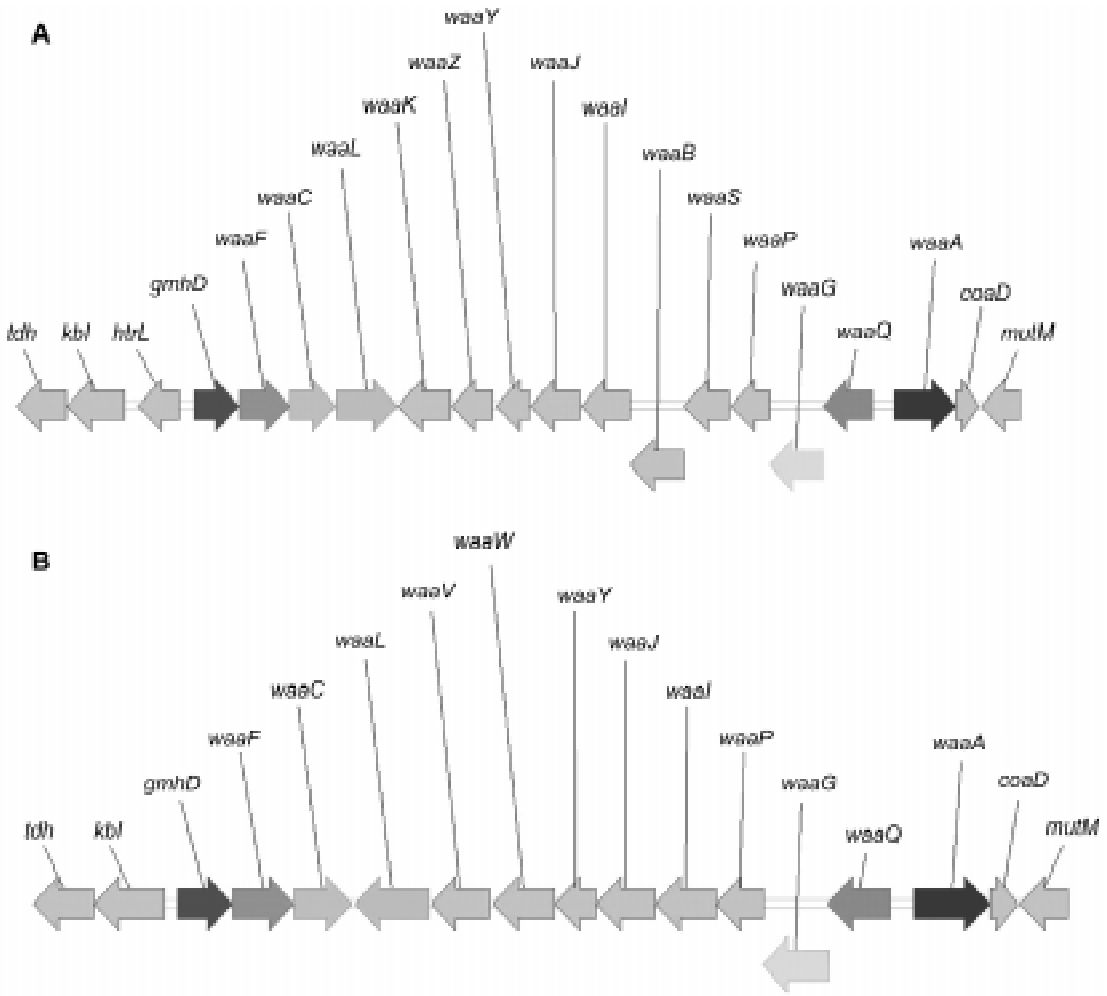
U pewnych rodzajów bakterii (np. *Yersinia* rys. 1B) w obrębie klasera *waa* może nie występować operon *waaQ*. Większość genów klastera *waa* koduje specyficzne glikozylotransferazy odpowiedzialne za proces syntezy części rdzeniowej.

2.1.1. Lokalizacja i charakterystyka klastera *waa*

Klaster *waa* we wszystkich analizowanych przypadkach zawsze znajduje się pomiędzy genami: *tdh* i *kbl* znajdującym się przed operonem *gmhD* oraz genem *mutM* leżącym za operonem *waaA*. Geny *mutM* i *kbl* mają zawsze przeciwną orientacje przestrzenną, wobec sąsiadujących z nimi genów operonów: *gmhD* i *waaA.*



Rys. 1. Porównanie budowy klasterów *waa*: u *Escherichia coli* CFT073 (A) i u *Yersinia enterocolitica* 8081 (B); brak operonu *waaQ* u *Y. enterocolitica* jest charakterystyczny dla wszystkich bakterii rodzaju *Yerisnia*



Rys. 2. Zróżnicowanie budowy klastera *waa*: *Escherichia coli* K-12 (A) i *Escherichia coli* UTI89 (B); zróżnicowanie tego samego klastera u różnych szczepów *E. coli* jest typowe dla tego gatunku

Geny należące do operonu *gmhD* i *waaA* mają tę samą orientację. Orientacja genów operonu *waaQ* zwykle jest przeciwna względem genów operonów *gmhD* i *waaA*. W obrębie operonu *waaQ* większość genów zwykle ma taki sam zwrot, choć zdarzają się wyjątki (np. *waaX* u *Erwinia carotovora* czy *waaI* u *Shigella flexneri*).

Lokalizacja genu *waaL* kodującego ligazę antygenu O jest bardzo zmienna. Zwykle znajduje się on w obrębie klastera *waa*, lecz u wielu gatunków bakterii (np. z rodzaju *Yersinia*) występuje on całkowicie poza tym regionem. Jeśli gen ten występuje wewnątrz klastera *waa* to sama lokalizacja oraz zwrot tego genu jest zróżnicowany, czasem nawet między szczepami pochodzącymi z tego samego gatunku, co ma miejsce na przykład u różnych szczepów *E. coli* (rys. 2A i 2B).

2.1.2. Operony *waaA* i *gmhD*

Operony te stanowią podstawowy i stały element strukturalny klastera *waa* (np. u bakterii *Candidatus Blochmannia pennsylvanicus* nie występują w nim żadne inne geny; rys. 3).

Operon *waaA* obejmuje gen *waaA* (oznaczany też jako *kdtA*) kodujący transferazę Kdo, oraz gen *coaD* (inaczej *kdtB*) kodujący adenylotransfeazę fosfopanteteinianową (PPAT) biorącą udział w biosyntezie Kdo [4, 8, 10]. Oba te geny cechuje bardzo wysoki

Rys. 3. Budowa klastera *waa* u *Candidatus Blochmannia pennsylvanicus*; jest to najprostszy znany klaster i zawiera on tylko podstawowe geny operonów *waaA* i *gmhD*

Tabela I

Zróżnicowanie występowania genów operonu *waaQ* u rożnych *Enterobacteriaceae*

	waaQ	*waaG*	*waaP*	*waaS*	*waaH*	*waaB*	*waaI*	*waaO*	*waaJ*	*waaR*	*waaY*	*waaT*	*waaW*	*waaV*	*waaX*	*waaZ*	*waaK*	*waaD*
C. rodentium	+	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	+	+	–
E. carotovora	+	+	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–
E. coli APEC01	+	+	+	–	–	–	+	–	–	+	+	–	+	+	–	–	–	–
E. coli CFT073	+	+	+	–	–	–	+	–	+	–	+	–	+	+	–	–	–	–
E. coli K12 oraz W3110	+	+	+	+	–	+	+	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–
E. coli O157	+	+	+	–	–	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	+
E. coli R1	+	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–
E. coli UTI89	+	+	+	–	–	–	+	–	+	–	+	–	+	+	–	–	–	–
K. pneumoniae 52145, *P. asymbiotica*, *P. luminescens, P. mirabilis*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
S. bongori S. enterica Choleraesuis CDC01005	+	+	+	–	+	+	+	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–
S. enterica Choleraesuis SC-B67	+	+	+	–	–	+	+	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–
S. enterica Paratyphi A, Typhi CT18, Typhi Ty2, Galinarium, Typhimurium LT2	+	+	+	–	–	+	+	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–
S. enterica Enteritidis	+	(2x)	+	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	–
S . enterica Typhimurium DT 104	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	+	+	–
S. enterica Typhimurium SL 1344	+	+	+	–	+	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	–
S. marcescens Db11 oraz N28b	(2x)	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
S. boydii	+	+	+	–	–	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–
S. dysenteriae M131649(M131)	+	+	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	–
S. dysenteriae Sd197	+	+	+	–	–	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–
S. flexneri 2a 2457T, 2a 301 oraz 5 8401	+	+	+	–	–	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	+
S. sonnei 53G	+	+	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–
S. sonnei Ss046	+	+	+	–	–	–	+	–	+	–	+	–	+	+	–	–	–	–

\+ – gen jest obecny,
– – gen jest nieobecny,
2x – są obecne dwa geny o podobnej sekwencji.

konserwatyzm kodowanej przez nie sekwencji białkowej (ok. 42% identycznych aminokwasów, ponad 90% aminokwasów o podobnych właściwościach chemicznych dla białka WaaA), co zapewne jest związane z powszechnym występowaniem Kdo w lipopolisacharydach.

Operon *gmhD* obejmuje co najmniej trzy geny: *gmhD*, *waaF* i *waaC*. Białko GmhD jest odpowiedzialne za ostatnią fazę syntezy GDP-d-glicero-α-d-mannoheptozy, substratu dla glikozylotransferaz [7] zaś białka WaaC i WaaF to heptozylotransferazy [5, 8]. Również te białka wykazują wysoki konserwatyzm swoich sekwencji aminokwasowych.

2.1.3. Operon waaQ

Operon ten jest najbardziej zróżnicowany spośród składników klastera *waa*. Nie występuje on w ogóle u bakterii z rodzaju *Yersinia*, ani *Candidatus*. U pozostałych analizowanych bakterii zidentyfikowano aż 18 różnych genów występujących w tym operonie. Niektóre geny występują u każdej bakterii – sa to np. gen *waaQ* kodujący heptozylotransferazę i *waaG* kodujący transferazę kw. galakturonowego [8, 11]. Inne są charakterystyczne dla rodzaju. Często też np. u bakterii *Escherichia coli* obserwowano wysoką zmienność składu genowego operonu *waaQ* zależną od szczepu (Tabela I). Przypuszczalne funkcje białek kodowanych przez geny tego operonu podano w Tabeli II [6]. Analiza homologii sekwencyjnej tych białek wykazała, że są one wysoce konserwatywne (75–80% homologii).

3. Operon *pbgPE* i podstawienie LPS 4-aminoarabinozą

Obecność aminocukru – 4-aminoarabinozy w lipopolisacharydzie jest związana z opornością bakterii na polimiksyny np. kolistynę. Najczęściej tym aminocukrem podstawione są fosforany obecne w lipidzie A [10]. U niektórych bakterii obserwowano też podstawienie Kdo, związanego bezpośrednio z lipidem A [13]. Geny kodujące białka niezbędne do przeprowadzenia reakcji takiego podstawienia znajdują się na operonie *pmrHFIJKLM* u *Salmonella enterica*, operonie *pbgPE* u *Photorhabdus luminescens* [1, 2], a także w genomach *Y. enterocolitica*, *S. proteamaculans* i *P. mirabilis*. Operon ten jest zlokalizowany w innym obszarze genomu niż klaster *waa*. Homologia białek kodowanych przez geny tego operonu jest u wszystkich badanych bakterii dość wysoka (od 60 do 80%).

4. Podstawianie heptoz fosfoetanoloaminą

U wielu bakterii heptozy w części rdzeniowej LPS są podstawione resztą fosfoetanoloaminy. Geny odpowiedzialne za to podstawienie zostały zidentyfikowane u *N. meningitidis Z2491* [14], *N.gonorrhoeae FA 1090* [9] i *H. somnus* [12]. Spośród analizowanych genomów *Enterobacteriaceae* białko o podobnej aktywności znaleziono jedynie u *P. mirabilis*, co jest w zgodzie w z wynikami analizy chemicznej struktury

Tabela II

Przypuszczalne funkcje genów operonu *waaQ* wg [6]

Gen	Przypuszczalna funkcja
waaA	Transferaza Kdo
gmhD	Epimeraza ADP-L-glycero-D-manno-heptozowa
waaC	Transferaza heptozowa (I)
waaF	Transferaza heptozowa (II)
waaQ	Transferaza heptozowa (III)
waaG	Transferaza heksozowa (I): LPS α1,3-glukozotransferaza
waaI	Transferaza heksozowa (II): LPS α1,3-galaktozotransferaza
waaO	Transferaza heksozowa (II): LPS α1,3-glukozotransferaza
waaJ	Transferaza heksozowa (III): LPS α1,2-glukozotransferaza
waaR	Transferaza heksozowa (III): LPS α1,2-glukozotransferaza
waaT	Transferaza heksozowa (III): LPS α1,2-galaktozotransferaza
waaB	Podstawienie heksozy (I): LPS α1,6-galaktozotransferaza
waaK	Podstawienie heksozy (III): LPS α1,2-N-acetyloglukozamionotransferaza
waaU	Podstawienie heksozy (III): Transferaza heptozowa (IV)
waaW	Podstawienie heksozy (III): LPS α1,2-galaktozotransferaza
waaV	Podstawienie heksozy (II): LPS β1,3-glukozotransferaza
waaX	Podstawienie heksozy (II): LPS β1,4-galaktozotransferaza
waaD	Podstawienie heksozy (III): LPS α1,2-glukozotransferaza
waaL	Ligaza O-antygenu
waaP	Fosforylacja heptozy (I)
waaY	Fosforylacja heptozy (II)
waaS	Prawdopodobna transferaza α-Rha-1 na 5-Kdo
waaZ	nieznana

części rdzeniowej LPS tej bakterii [13]. Gen tego białka znajduje się poza klasterem *waa*, jednak w niewielkiej odległości od niego. Homologia sekwencyjna wszystkich białek podstawiających fosfoetanoloaminę wynosi ok. 50%.

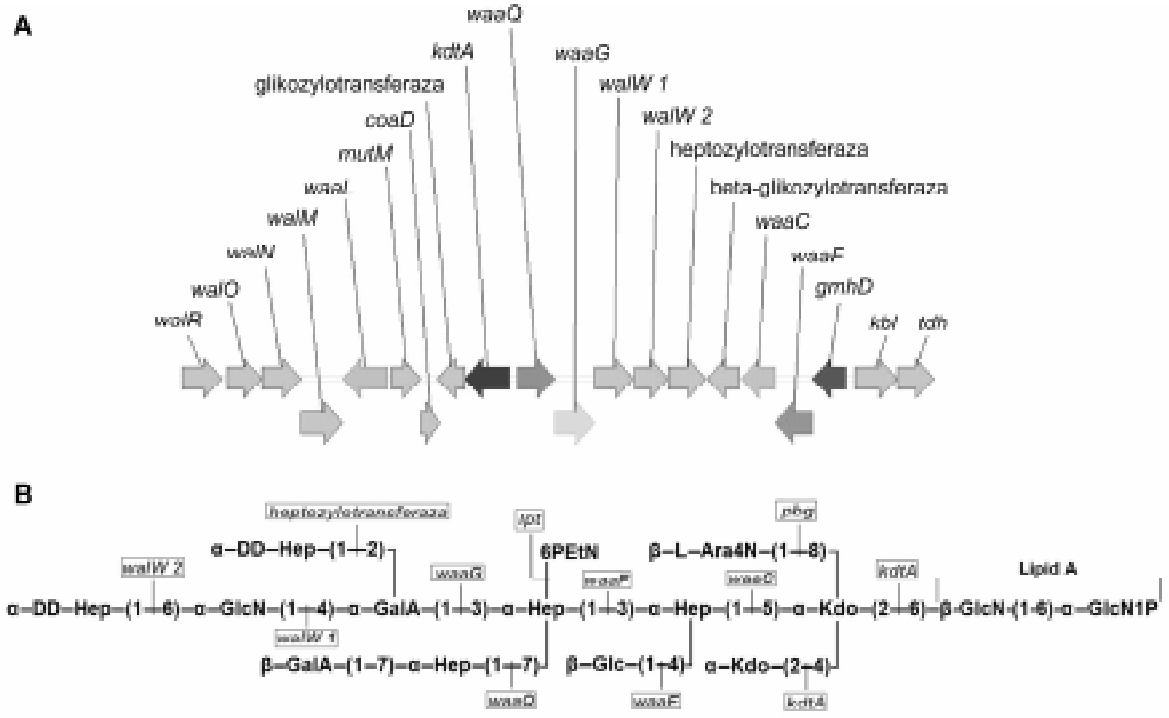
5. Geny biosyntezy części rdzeniowej LPS u *Proteus mirabilis*

Bazując na analizie porównawczej białek klastera *waa* oraz enzymów inkrustujących cześć rdzeniową lipopolisacharydu podjęto próbę zidentyfikowania genów odpowiedzialnych za biosyntezę tego fragmentu LPS pałeczek *P. mirabilis*. Struktura fragmentu rdzeniowego lipopolisacharydu została u tej bakterii opisana wcześniej [13]. Bazując na analizie homologii sekwencyjnej zidentyfikowano większość genów odpowiedzialnych za poszczególne etapy tej biosyntezy. Rysunek 4 przedstawia strukturę klastera *waa* oraz funkcje poszczególnych enzymów, kodowanych przez geny tego klastera, zobrazowane na schemacie przedstawiającym budowę chemiczną fragmentu rdzeniowego LPS. Nie udało się zidentyfikować enzymu dla podstawienia bocznej heptozy wiązaniem α (1–7) przez kwas β-galakturonowy. Ponadto dla wielu genów kodujących glikozylotransferazy nie udało się przyporządkować odpowiedniego wiązania. Tym niemniej udało się skutecznie przypisać większości genów ich funkcje. Udało się także zidentyfikować geny odpowiedzialne za podstawienie molekuł inkrustujących (geny *pbg* dla 4-aminoarbinozy oraz gen *lpt* dla fosfoetanoloaminy). Geny te są zlokalizowane poza klasterem *wwa*.

6. Podsumowanie

Komputerowa analiza porównawcza wybranych sekwencji aminokwasowych białek związanych z biosyntezą fragmentu oligosacharydu rdzeniowego lipopolisacharydów w rodzinie *Enterobacteriaceae* wykazała, że dzielą się one na dwie grupy. Do pierwszej należą białka kodowane przez geny operonu *waaQ*. Występowanie i lokalizacja w klasterze ich genów jest zróżnicowana. Sekwencja aminokwasowa tych białek jest też mniej zachowawcza niż sekwencje białek należących do grupy drugiej, do której należą białka konserwatywne, związane głownie z biosyntezą rdzenia wewnętrznego. Kodujące je geny zgrupowa0 ne są w zewnętrznej części klastera *waa* (operony *waaA* oraz *gmhD*), a także poza tym klasterem (operon *pmr*/*pbg* oraz gen trasnferazy fosfoetanoloaminy – *lpt* u *P. mirabilis*).

Komputerowa analiza porównawcza pozwala na identyfikację enzymów odpowiedzialnych za kolejne etapy biosyntezy części rdzeniowej lipopolisacharydów, oraz na przypisanie funkcji genom kodującym te enzymy. Można mieć nadzieję, że umożliwi ona pró-



Rys. 4. Budowa klastera *waa* (A) i struktura oligosacharydu rdzeniowego LPS (B) *Proteus mirabilis*; na rysunku B przedstawiono identyfikację genów klastera *waa*, kodujących enzymy tworzące poszczególne wiązania fragmentu rdzeniowego LPS.

by przewidywania budowy chemicznej rdzenia LPS na podstawie sekwencji genomu bakteryjnego, a także na skonstruowanie systemu „uniwersalnych" starterów PCR homologicznych do tych genów i pozwalających na łatwą ich identyfikację.

Piśmiennictwo

1. Bennet H.P.J. Clark D.J.: The *pbgPE* operon in *Photorhabdus luminescens* Is Required for Patogenicity and Symbiosis. *J. Bacteriol.* **187**, 71–84 (2005)
2. Derzelle S., Turlin E., Duchaud E., Pages S., Kunst F., Givaudan A., Danchin A.: The PhoP-PhoQ Two-Component Regulatory System of *Photorhabdus luminescens* Is Essential for Virulence in Insects. *J. Bacteriol.* **186**, 1270–1279 (2004)
3. Fresno S., Jiménez N., Canals R., Merino S., Corsaro M.M., Lanzetta R., Parrilli M., Pieretti G., Regué M., Tomás J.M.: A second galacturonic acid transferase is required for core lipopolysaccharide biosynthesis and complete capsule association with the cell surface in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **189**, 1128–1137 (2007)
4. Geerlof A., Lewendon A., Shaw W.V.: Purification and characterization of phosphopantetheine adenylyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 27105–27111 (1999)
5. Gronow S., Brabetz W., Brade H.: Comparative functional characterization *in vitro* of heptosyltransferase I (WaaC) and II (WaaF) from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6602–6611 (2000).
6. Heinrichs D.E., Yethon J.A., Whitfield C.: Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **30**, 221–232 (1998)
7. Kneidinger B., Graninger M., Puchberger M., Kosma P., Messner P.: Biosynthesis of nucleotide-activated D-glycero-D-manno-heptose. *J. Biol. Chem.* **276**, 20935–20944 (2001).
8. Noah C., Brabetz W., Gronow S., Brade H.: Cloning, sequencing, and functional analysis of three glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the inner core region of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide. *J. Endotoxin Res.* **7**, 25–33 (2001)
9. O'Connor E.T., Piekarowicz A., Swanson K.V., McLeod Griffiss Stein D.C.: Biochemical analysis of Lpt3 a Protein Responsible for Phosphoethanolamine Addition to Lipopolisaccharide of Patogenic *Neisseria*. *J. Bacteriol.* **188**, 1039–1048 (2006)
10. Raetz C.R., Whitfield C.: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635–700 (2002)
11. Regué M., Climent N., Abitiu N., Coderch N., Merino S., Izquierdo L., Altarriba M., Tomás JM.: Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae waa* gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **183**, 3564–3573 (2001)
12. St.Michael F., Inzana T.J. i Cox A.D.: Structural analysis of the lopooligosaccharide – derived oligosaccharide of *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) strain 8025. *Carbohydrate Res.* **341**, 281–284 (2006)
13. Vinogradov E., Radziejewska-Lebrecht J., Kaca W.: The structure of the carbohydrate backbone of core-lipid A region of the lipopolisaccharides from *Proteus mirabilis* wild-type strain S1959 (serotype O3) and its Ra mutant R110/1959. *Eur. J. Biochem*. **267**, 262–268 (2000)
14. Wright C., Hood D.W., Randle G.A., Makepeace K., Cox A.D., Jianjun Li, Chalmers R., Richards J.C., Moxon E.R.: *lpt6*, a Gene Required for Addition of Phosphoethanolamine to Inner-Core Lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae. J. Bacteriol.* **186**, 6970–6982 (2004)

Praca powstała w ramach projektu NN304411433 (MNiSW)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 191–197
http://www.pm.microbiology.pl

ORGANIZACJA STRUKTUR ZEWNĘTRZNYCH BAKTERII GRAM-UJEMNYCH A PROCES AKTYWACJI UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Gabriela Bugla-Płoskońska

Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, tel. (71) 375 63 06, e-mail: gabi@microb.uni.wroc.pl

1. Wstęp – organizacja struktur zewnętrznych bakterii Gram-ujemnych. 2. Lipopolisacharyd, białka błony zewnętrznej, otoczki oraz fimbrie jako składowe osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych. 3. Błona zewnętrzna bakterii Gram-ujemnych a aktywacja układu immunologicznego. 4. Struktury zewnętrzne bakterii Gram-ujemnych a bakteriobójcze działanie surowicy. 5. Mimikra cząsteczkowa bakteryjnych antygenów polisacharydowych. 6. Podsumowanie

Structure of the Gram-negative bacterial cell wall and the activation of the immune system

Abstract: Gram-negative bacteria are covered by cells membrane, peptydoglycan and outer membrane. Outer membrane contains phospholipids, outer membrane proteins (OMPs) and lipopolysaccharides (LPS). The possibility of activation of innate system by bacterial cell structures depends on the structure and organisation of bacterial outer membrane. Sialic acid not a common component in bacteria has been found in O-specific region of LPS, of some serotypes, as a component of the capsular polysaccharide of envelope and plays an essential role in protecting Gram-negative bacteria against bactericidal activity of serum. Molecular mimicry is called as structural, serological and functional homology and similarity between microbial antigens and host tissue. This homology is considered as important pathogenic factor involved in several autoimmune diseases. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides, capsules and outer membrane proteins has been reporter to contribute to the pathogenesis of certain bacteria.

1. Introduction – the structure of Gram-negative bacterial cell wall. 2. Lipopolysaccharides, outer membrane proteins, capsules and fimbriae as components of cell wall of Gram-negative bacteria. 3. Outer membrane of Gram-negative bacteria and the activation of the immune system. 4. Outer membrane and the bactericidal action of serum. 5. Molecular mimicry of polysaccharide antigens of bacteria. 6. Summary

Słowa kluczowe: białka błony zewnętrznej, lipopolisacharyd, mimikra, układ białek dopełniacza
Key words: outer membrane proteins, lipopolysaccharide, mimicry, complement

1. Wstęp – organizacja struktur zewnętrznych bakterii Gram-ujemnych

Zdrowy organizm człowieka posiada dobrze zorganizowany i funkcjonujący układ immunologiczny zapewniający obronę przed ewentualnymi atakami mikroorganizmów, w tym bakterii Gram-ujemnych. Zewnętrzne osłony komórkowe bakterii Gram-ujemnych biorące udział w odpowiedzi na lityczne działanie układu białek dopełniacza czy niektórych komórek cytotoksycznych odgrywają szczególną rolę w mechanizmach odporności przeciwbakteryjnej.

Zewnętrzne osłony bakterii Gram-ujemnych ze względu na skład chemiczny, budowę oraz organizację są bardzo złożonymi strukturami komórek prokariotycznych [25]. W skład osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych wchodzą trzy regiony: błona cytoplazmatyczna (IM, ang. *inner membrane*), mureina (peptydoglikan, PG) oraz błona zewnętrzna (OM, ang. *outer membrane*). Miejsca kontaktu między CM, a OM nazywane są strefami adhezji (złącza Bayer'a) [4].

Błona cytoplazmatyczna zbudowana jest z fosfolipidów i białek. Fosfolipidy tworzą warstwę płynno-krystaliczną, w której zanurzone są białka strukturalne i enzymatyczne. Główne bakteryjne fosfolipidy to: fosfatydyloetanoloamina, fosfatydyloglicerol, difosfatydyloglicerol oraz kardiolipina. Białka błony cytoplazmatycznej bardzo zróżnicowane pod względem swoich funkcji stanowią nawet do 70% suchej masy błony [20, 25].

Pomiędzy błoną cytoplazmatyczną a błoną zewnętrzną znajduje się **przestrzeń peryplazmatyczna**. Największy obszar przestrzeni peryplazmatycznej zajmuje mureina. W przestrzeni peryplazmatycznej występują także białka PAL (*peptidoglycan-associated lipoproteiny*) oraz oligosacharydy membranowe MDO (*membrane derived oligosaccharides*), a także lipoproteiny. **Mureina** (peptydoglikan) to heteropolimer złożony z łańcuchów cukrowych, na które składają się ułożone na przemian reszty *N*-acetylo-glukozoaminy (GlcNAc) oraz kwasu *N*-acetylomuraminowego (MurNAc) połączone wiązaniem β-1,4-glikozydowym. Grupy karboksylowe kwasu muraminowego są z reguły podstawione pentapeptydem. Łańcuch cukrowy peptydoglikanu ma raczej budowę stałą, część peptydowa wykazuje zaś dość znaczne zróżnicowanie w zależ-

ności od gatunku bakterii, warunków wzrostu czy wieku komórki. Typowymi aminokwasami występującymi w peptydach bakterii Gram-ujemnych są: L-alanina, kwas D-glutaminowy, kwas *mezo*-diaminopimelinowy, L-lizyna oraz D-alanina. Kwas *mezo*-diaminopimelinowy (*m*-DAP) u bakterii Gram-ujemnych odgrywa istotną rolę w sieciowaniu struktury mureiny [15, 25].

Istnieją dwie koncepcje architektury peptydoglikanu bakterii Gram-ujemnych. W jednej z nich mureina przedstawiona jest jako struktura tworząca warstwy układające się równolegle w stosunku do powierzchni błony cytoplazmatycznej. Warstwy te połączone są mostkami peptydowymi. W drugiej koncepcji przedstawionej w 2005 przez D i m i t r i e v' a [12] łańcuchy GlcNac oraz MurNac są zorientowane prostopadle stosunku do powierzchni błony cytoplazmatycznej, a mostki peptydowe równolegle oplatają komórkę.

Błona zewnętrzna u bakterii Gram-ujemnych podobnie jak błona cytoplazamtyczna wykazuje budowę chrakterystyczną dla błon biologicznych tj. budowę tzw. „płynnej mozaiki". Jednak błony OM i IM różnią się zawartością protein, oraz aktywnością wielu enzymów. W OM można stwierdzić aktywność enzymatyczną fosfolipaz, lizofosfolipaz, proteaz, peptydaz sygnałowych, czy fosfataz kwasu lizofosfatydowego [18]. U bakterii jelitowych błona zewnętrzna zawiera wspólny enterobakteryjny antygen ECA (*Enterobacterial Common Antigen*). ECA zbudowany jest z części lipidowej (glicerolo-3-fosforan z estrowo związanymi kwasami tłuszczowymi), z którą związany jest łańcuch cukrowy (powtarzające się jednostki 4-acetamido-4,6-dideoksy-D-galaktozy, *N*-acetylo-D-glukozaminy i kwasu *N*-acetylo-D-mannozaminouronowego). Niewiele wiadomo o znaczeniu obecności ECA dla komórki bakteryjnej. Zdolność wiązania przez ECA jonów Ca^{++} wskazywałaby, że antygen ten może mieć wpływ na bilans wapnia w komórce [25, 28].

2. Lipopolisacharyd, białka błony zewnętrznej, otoczki oraz fimbrie jako składowe osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych

Lipopolisacharyd (LPS, endotoksyna bakteryjna) jest główną strukturą powierzchniową jaką eksponują na zewnątrz komórki bakterie Gram-ujemne. W obrębie LPS form gładkich bakterii (S – *smooth cells*) wyróżnia się trzy regiony: O-swoiste łańcuchy boczne, polisacharydowy rdzeń oraz lipid A [25]. Mutanty R – *rough cells*, tzw. formy szorstkie wytwarzają LPS zwierający lipid A i oligosacharyd rdzeniowy pozbawiony łańcucha O-swoistego.

Istnieją dwie główne grupy mutantów R:

– mutanty Ra – posiadające defekt w biosyntezie łańcucha O-swoistego i produkujące kompletny rdzeń połączony z lipidem A,
– mutanty Rb÷Re – wykazujące defekt w biosyntezie rdzenia i syntetyzujące niekompletny rdzeń.

Bakterie mogą również syntetyzować LPS w formie półszorstkiej (SR), gdzie łańcuch O-swoisty zawiera tylko pojedynczą jednostkę oligosacharydową [31].

Część O-swoista LPS (antygen O) w skład, którego wchodzi od jednej do ośmiu reszt węglowodanowych nadająca swoistość serologiczną formom gładkim bakterii Gram-ujemnych jest elementem silnie immunogennym. W skład części O-swoistej LPS może wchodzić kwas sjalowy (pochodna kwasu neuraminowego, czyli kwasu 5-amino-3,5 dideoksy-D-glicero-D-galakto-nonulozonowego) [17, 22]. Kwas sjalowy nie jest powszechnym składnikiem struktur powierzchniowych bakterii. Obecność kwasu sjalowego w polisacharydzie otoczkowym bakterii wykazał w 1958 roku B a r r y [3]. W 1977 J a n n i wsp. wyróżnili trzy serotypy *Escherichia coli* zawierające kwas sjalowy w LPS, były to: O24, O56, O104 [17]. W roku 1978 wykazano, że kwas sjalowy jest integralną częścią łańcucha O-swoistego LPS *Salmonella* Toucra O48 [22].

Oligosacharyd rdzeniowy jest fragmentem LPS znajdującym się pomiędzy łańcuchem O-swoistym a lipidem A. Z lipidem A połączony jest wiązaniem ketozydowym. Rdzeń w LPS wykazuje mniejsze zróżnicowanie strukturalne w porównaniu do antygenu O. W budowie rdzenia wyróżnia się jego część wewnętrzną i zewnętrzną. Rdzeń zewnętrzny jest bogaty w heksozy, a rdzeń wewnętrzny w heptozy oraz kwas 3-deoksy-*D-manno*-oktulozonowy (Kdo).

Endotoksycznie aktywny lipid A jest najbardziej konserwatywną częścią LPS. Lipid A posiada: hydrofilowy szkielet cukrowy, do którego kowalencyjnie związane są cztery cząsteczki kwasów tłuszczowych typu (R)-3-hydroksy, wśród których przynajmniej dwie reszty są acyloksyacylowe [16].

Białka błony zewnętrznej (OMPs – *outer membrane protein*). Niemal połowę masy OM bakterii Gram-ujemnych stanowią białka integralne oraz międzybłonowe lipoproteiny zakotwiczone w błonie. Integralne białka OMPs zbudowane są z amfipatycznych, równolegle do siebie ułożonych β-wstęg, które fałdują się w cylindryczne struktury występujące jako monomery (np. OmpA, FhuA), dimery (Omp1A) lub trimery (OmpF, LamB). Wnętrza tych struktur tworzy jeden kanał lub kanały [29]. Wybrane białka OMP jako czynniki wirulencji bakterii Gram-ujemnych zestawia tabela I.

Niektóre bakterie Gram-ujemne syntetyzują na zewnątrz OM **otoczki polisacharydowe** (CPS – *capsular polysaccharide*), czyli zewnątrzkomórkowe substancje mogące luźno lub ściśle przylegać do komórki. Budowa chemiczna otoczek bakteryjnych jest bardzo zróżnicowana, ale również w obrębie tych struktur komórkowych wykazano obecność kwasu sjalowego, co ma kluczowe znaczenie w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej skierowanej na te antygeny. Wystę-

Tabela I

OMPs jako czynniki wirulencji bakterii Gram-ujemnych [1, 5, 10, 23, 26, 29]

OMP	Funkcja	Występowanie
OmpF	pośredniczy w adherencji do makrofagów	*Escherichia coli*
OmpA Tra T	udział w wirulencji bakterii poprzez neutralizację mechanizmów obronnych gospodarza – warunkuje oporność na bakteriobójcze działanie dopełniacza	
OmpD	udział w adhezji do komórek nabłonkowych	*Salmonella* Typhimurium
PagC Rck	warunkuje przeżycie komórek bakterii w makrofagach blokuje powstawanie kompleksu MAC	
OmpT OmpU	warunkuje oporność na działanie soli żółciowych ułatwia kolonizację jelit	*Vibrio cholerae*
Ail	udział w adhezji do komórek epitelialnych warunkuje oporność na bakteriobójcze działanie dopełniacza	*Yersinia enterocolitica*
BrkA	warunkuje oporność na bakteriobójcze działanie dopełniacza	*Bordetella pertussis*
DsrA Opa, Opc	warunkuje oporność na bakteriobójcze działanie dopełniacza adhezyny	*Haemophilus ducreyi* *Haemophilus influenzae*
OmpK36	aktywuje klasyczną ścieżkę układu dopełniacza	*Klebsiella pneumoniae*
OprF	adhezja do komórek nabłonka płucnego	*Pseudomonas aeruginosa*
BabA2	adhezja do receptorów gospodarza na komórkach błony śluzowej żołądka lub dwunastnicy	*Helicobacter pylori*
PorB	adhezja do błon komórek gospodarza	*Neisseria gonorrhoeae*

powanie kwasu polisjalowego w antygenie otoczkowym stwierdzono u *E. coli* K1, *E. coli* K92, *Neisseria meningitidis* grupy B oraz C, a także *Pasteurella haemolytica* A2 [36].

Fimbrie, jako elementy wchodzące w skład osłon komórkowych wytwarzają głównie bakterie Gram-ujemne, rzadziej Gram-dodatnie. Fimbrie wykazują duże zróżnicowanie pod względem budowy oraz funkcji. Jeden gatunek bakterii może wytwarzać kilka różnych rodzajów fimbrii. Fimbrie zbudowane są z białek (białkowy monomer strukturalny to fimbryna), czasami podlegających glikozylacji (u *N. gonorrhoeae*) [21].

3. Błona zewnętrzna bakterii Gram-ujemnych a aktywacja układu immunologicznego

Proces zakażenia wywoływanego przez bakterie Gram-ujemne warunkowany jest zdolnością bakterii do przemieszczania się pomiędzy gospodarzami, a także wykształceniem cech umożliwiających im kolonizację organizmu gospodarza, namnażanie się w nim i jednocześnie unikanie aktywności układu immunologicznego. Cechy komórek bakterii Gram-ujemnych, które umożliwiają im powyższe czynności określane są mianem czynników wirulencji. Do czynników wirulencji bakterii Gram-ujemnych można zaliczyć m.in. wytwarzanie toksyn cytolitycznych, enzymów takich jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, proteaza, a także obecność w błonie zewnętrznej LPS, CPS, pewnych OMPs oraz wytwarzanie fimbrii.

Ważną cechą wielu chorobotwórczych bakterii Gram-ujemnych jest ich adhezja do komórek gospodarza, co w konsekwencji prowadzi do kolonizacji tkanek, namnażania się bakterii, rozprzestrzenienia się ich w organizmie oraz do rozwoju stanu zapalnego. W proces adhezji zaangażowane są takie struktury komórki bakterii jak otoczki, fimbrie, lipopolisacharydy, substancje śluzowe wydzielane do środowiska a także pewne OMPs. Przykłady OMPs zaangażowanych w proces adhezji do komórek gospodarza zestawione są w tabeli I.

Niektóre ze struktur powierzchniowych bakterii Gram-ujemnych np. fimbrie typu 1 występujące u patogennych i nie patogennych *E. coli* zaangażowane są w proces adhezji oraz jednocześnie aktywują układ immunologiczny poprzez wiązanie się do neutrofili, makrofagów i limfocytów, co uruchamia z kolei wydzielanie przez nie mediatorów zapalnych, oraz inicjuje proliferację limfocytów i wydzielanie przeciwciał. Pierwszymi komórkami układu odpornościowego, które spotykają się z bakteriami wytwarzającymi fimbrie i zakażającymi układ moczowy są mastocyty. Pobudzone mastocyty wydzielają histaminę, TNFα, leukotrien B_4 [21].

OMPs bakterii Gram-ujemnych są antygenami dla przeciwciał skierowanych przeciwko komórkom bakterii. Niektóre bakterie Gram-ujemne mają zdolność przylegania do komórek fagocytujących wykorzystując w tym celu właśnie OMPs. Przykładem jest *S.* Typhimurium wykorzystująca białko OmpC, w przyleganiu do makrofagów. Uważa się, że białko to ma swój wkład w początkowe rozpoznanie bakterii przez makrofagi [14]. Poryna PorB występująca w błonie zewnętrznej bakterii z rodzaju *Neisseria* także odgrywa znaczącą rolę w procesie odpowiedzi immunologicznej poprzez aktywację limfocytów B oraz komórek

układu APC (*Antigen Presenting Cell*) [26]. Makrofagi ludzkie i mysie mogą ulegać aktywacji w wyniku ich połączenia z OmpA *K. pneumoniae.* Obserwacja ta daje podstawę do wysunięcia hipotezy, iż w związku z tym, że OmpA występuje często w błonie zewnętrznej *Enterobacteriaceae* i jest białkiem konserwatywnym, układ immunologiczny kręgowców nabył zdolność do rozpoznawania tego białka na powierzchni drobnoustrojów, co umożliwia aktywację układu immunologicznego poprzez tę klasę bakteryjnych białek błony zewnętrznej [9, 35].

Aktywność biologiczna każdej substancji zależy od jej budowy chemicznej i powinowactwa do białek ustroju. Dotyczy to także endotoksyny bakteryjnej odgrywającej znaczącą rolę w patogenezie wielu chorób. Z uwolnionym z komórki bakterii LPS wiążą się obecne w surowicy białka. Najważniejszymi z tych białek są: HDL (*High Density Lipoprotein*) oraz LBP (*Lipopolysaccharide Binding Protein*) [38]. HDL tworzy kompleksy z LPS zarówno form S jak i R bakterii. LBP wiąże lipid A oraz lipopolisacharydy również form S jak i R bakterii. Uwolnienie LPS z powierzchni błony zewnętrznej drobnoustroju do krwiobiegu gospodarza powoduje ujawnienie się jego aktywności biologicznej. Część O-swoista LPS wykazuje zdolność aktywacji układu dopełniacza na drodze alternatywnej, a efektywność tej aktywacji jest najprawdopodobniej uwarunkowana strukturą powtarzających się jednostek antygenu O-swoistego [33]. Oligosacharyd rdzeniowy aktywuje limfocyty B, indukuje wytwarzanie IL-1, uczestniczy w wiązaniu LPS do hepatocytów i białek surowiczych oraz modyfikuje endotoksyczne właściwości lipidu A. Część zewnętrzna rdzenia lipopolisacharydu wiąże także receptory powierzchniowe na limfocytach T a także aktywuje dopełniacz [28, 34]. Lipid A zachowuje aktywność toksyczną nawet po jego oddzieleniu od reszty LPS, co wskazuje że wiązanie i rozpoznawanie lipidu A przez komórki układu immunologicznego jest konieczne i wystarczające do rozpoczęcia procesu zapalnego [24]. Lipid A aktywuje makrofagi i monocyty, co prowadzi do wytwarzania i uwalniania przez nie mediatorów procesu zapalnego: prostaglandyn, leukotrienów, TNFα oraz interleukin (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10). Wysokie stężenie tych substancji w organizmie człowieka i zwierząt prowadzi do podniesienia temperatury ciała, obniżenia ciśnienia krwi, aktywacji układu dopełniacza [32, 33].

4. Struktury zewnętrzne bakterii Gram-ujemnych a bakteriobójcze działanie surowicy

Aktywność bakteriobójcza surowicy stanowi jeden z mechanizmów chroniących organizm wyższy przed zakażeniami wywoływanymi przez bakterie Gram-ujemne. Bakterie Gram-ujemne należące do jednego gatunku, rodzaju, a nawet serotypu są w różnym stopniu wrażliwe na bakteriobójcze działanie surowicy [6–8, 27]. W mechanizmie bakteriobójczego działania surowicy kluczową rolę odgrywa układ białek dopełniacza (komplement). Aktywacja układu dopełniacza może zachodzić na drodze klasycznej, alternatywnej i lektynowej [32]. Różnice w poziomie wrażliwości, a także przyczyny oporności bakterii Gram-ujemnych na bakteriobójcze działanie surowicy nie są dotychczas w pełni poznane i wyjaśnione, jednak badania wskazują, że zjawiska te związane są z ochronną rolą komórkowych struktur powierzchniowych bakterii tj. LPS, otoczek a także białek powierzchniowych [7, 8, 27]. Wśród szczepów *N. meningitidis* należących do typów A, B i C obserwuje się występowanie dużego odsetka szczepów opornych na bakteriobójcze działanie surowicy. Składnikiem otoczki B jest kwas sjalowy hamujący aktywację dopełniacza na drodze alternatywnej poprzez umożliwienie wiązania czynnika H do białka C3b. P l u s c h e i wsp. [30] wykazali, że obecność otoczki K1 jest jednym z elementów niezbędnych dla wytworzenia stanu oporności na surowicę pałeczek *E. coli*. Jednak badania własne [8] wykazały, iż duża grupa szczepów *E. coli* posiadających polisacharyd otoczkowy K1 będący liniowym homopolimerem kwasu 2,8 N-acetylo-neuraminowego wykazywała wrażliwość na bakteriobójcze działanie dopełniacza surowicy ludzkiej. Prawdopodobnie, o poziomie wrażliwości na komplement decyduje nie tyle fakt posiadania otoczki K1, a ilość kwasu sjalowego, jaki buduje tę otoczkę. Działanie ochronne wobec komplementu może wywierać również antygen powierzchniowy K5 niektórych szczepów *E. coli* [11].

Ważną rolę w ochronie bakterii Gram-ujemnych przed działaniem dopełniacza pełnią O-swoiste łańcuchy LPS [37]. Szczepy typu gładkiego wykazują często niewielką wrażliwość na bakteriobójcze działanie surowicy, co tłumaczy się łatwym usuwaniem z powierzchni ich komórek kompleksu MAC (*membrane attack complex*), zanim wejdzie on w trwałe hydrofobowe połączenia z lipidem A, zapoczątkowując tym samym proces lizy komórki docelowej. Jednak wiele gładkich szczepów bakterii Gram-ujemnych pomimo posiadania kompletnych łańcuchów O-swoistych jest wrażliwych na bakteriobójcze działanie dopełniacza, co sugerowałoby udział innych struktur powierzchniowych w tym procesie (OMPs) [7, 8, 27].

Wobec litycznego działania komplementu ochronne działanie mogą wykazywać także białka OMPs. Takie działanie ochronne (przestrzenne uniemożliwianie wbudowywania się kompleksu MAC w struktury osłon zewnętrznych) wykazano m.in. w przypadku szczepów *Campylobacter fetus*, *E. coli*, *N. gonorrhoeae* oraz *Aeromonas salmonicida.* Białka błony ze-

Tabela II

Przykłady wybranych schorzeń u podłoża których leży zjawisko mimikry molekularnej struktur powierzchniowych bakterii Gram-ujemnych do epitopów obecnych w komórkach gospodarza [19, 36]

Mikroorganizm	Objawy obserwowane w organizmie człowieka	Antygen wykazujący mimikrę
E. coli K1, *Neisseria meningitidis* grupy B	otoczkowy homopolimer kwasu sjalowego połączony wiązaniem α(2→8) – identyczny ze składnikiem cząsteczek adhezyjnych N-CAM komórek nerwowych	● namnożenie bakterii w krwioobiegu, możliwe przełamanie bariery krew-mózg ● zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych ● bakteriemia u noworodków i osób dorosłych ● zakażenia dróg moczowych
Campylobacter jejunii	terminalny kwas sjalowy na krótkim łańcuchu oligosacharydowym rdzenia LOS – połączenie kwasu sjalowego z rdzeniem jest podobne do połączenia występującego w glikolipidach i glikoproteinach na powierzchni komórek ssaków (gangliozydy GM1 obwodowego układu nerwowego)	● zespół Guillain-Barrè (GBS) – polineuropatia z postępującym osłabieniem mięśni ● zespół Miller-Fisher'a (MFS)
Helicobacter pylori	O-swoiste łańcuchy LPS wykazują mimikrę cząsteczkową do antygenów grupowych krwi Lewis(x) i Lewis(y) – ekspresjonowanych m.in. w tkance nabłonkowej żołądka	● dzięki zjawisku mimikry LPS wykazuje słabą aktywność immunologiczną ● przełamanie tolerancji immunologicznej prowadzi do reakcji krzyżowych z antygenami śluzówki żołądka
Yersinia, Shigella, Salmonella	O-swoiste łańcuchy LPS wykazują mimikrę do różnych typów ludzkiego kolagenu	● reaktywny artretyzm

wnętrznej bakterii Gram-ujemnych odpowiedzialn są jednak nie tylko za ochronę komórek bakterii przed cytolitycznym działaniem surowicy, ale niektóre z nich mają zdolność aktywowania układu dopełniacza. Przykładem są poryny *S.* Typhimurium, *S. minnesota*, *K. pneumoniae* oraz *A. hydrophila* aktywujące układ dopełniacza na drodze klasycznej bądź alternatywnej [2]. Aktywacja układu dopełniacza za pośrednictwem tych poryn polega na rozpoznaniu i zdeponowaniu na eksponowanych w środowisku OMPs białek opsonizacyjnych C3b, co następnie skutkuje aktywacją i przyłączeniem kolejnych składowych dopełniacza, a w konsekwencji wytworzeniem MAC, zdeponowaniem go na powierzchni komórki bakterii i lizą wrażliwych na komplement komórek bakteryjnych.

Nie jest wykluczone, iż dopiero jednoczesna synteza konkretnych białek błony zewnętrznej, lipopolisacharydu typu gładkiego oraz dodatkowo otoczek zapewnia szczepom bakteryjnym pełną oporność na lityczne działanie surowicy.

Na atak ze strony układu odpornościowego szczególnie narażone są patogeny, których cykl życiowy w całości lub tylko częściowo związany jest z układem krwionośnym i/lub limfatycznym. Dlatego też mikroorganizmy dysponują jeszcze innymi, niż wyżej wymienione, sposobami unikania reakcji obronnych ze strony żywiciela. Do mechanizmów tych można zaliczyć: opuszczanie obszarów o wzmożonej aktywności immunologicznej, „maskowanie" miejsc na powierzchniach komórek, które najsilniej wzbudzają odpowiedź immunologiczną, usuwanie zdeponowanych na ścianie komórkowej składników dopełniacza poprzez ich enzymatyczny rozkład (najczęściej białka C3a i C3b), zmianę aktywności białek układu dopełniacza poprzez fosforylację, oraz udział w zjawisku mimikry molekularnej [39].

5. Mimikra molekularna (cząsteczkowa) bakteryjnych antygenów polisacharydowych

Zjawisko mimikry cząsteczkowej polega na występowaniu homologii strukturalnej, serologicznej lub biologicznej pomiędzy antygenami mikroorganizmu a antygenami obecnymi u gospodarza. Produkowanie przez patogenny drobnoustrój antygenów bardzo podobnych do występujących u gospodarza jest bardzo korzystne dla mikroorganizmu, gdyż chroni go przed rozpoznaniem przez układ immunologiczny gospodarza i dzięki temu umożliwia mu przeżycie. Pojawiająca się tolerancja immunologiczna na obecność obcych antygenów, lecz tożsamych z własnymi strukturami sprawia, że bakteria nierozpoznawalna jako „obca" przez system obronny może migrować i namnażać się w organizmie, co prowadzić może do zakażeń, wstrząsu septycznego, a także chorób immunologicznych.

Mechanizmy autoimmunizacyjne leżą u podstaw wielu chorób narządowo swoistych i układowych. W patogenezie chorób autoimmunizacyjnych istotną rolę przypisuje się czynnikom genetycznym, czy środowiskowym jednak istotna w rozwoju wielu chorób jest reakcja krzyżowa bakteria-gospodarz [32]. Związek miedzy mimikrą molekularną a rozwojem choroby autoimmunizacyjnej odkryto na początku lat

osiemdziesiątych XX wieku [13]. Przykłady chorób autoimmunizacyjnych u podłoża, których upatruje się wcześniejszej infekcji wywołanej przez bakterie Gram-ujemne zestawione są w tabeli II.

6. Podsumowanie

Istnieje silna korelacja pomiędzy aktywacją układu immunologicznego a budową struktur powierzchniowych bakterii Gram-ujemnych tj. łańcuchów O-swoistych lipopolisacharydu i białek powierzchniowych, otoczek i fimbrii. Przyczyna oporności bakterii Gram-ujemnych na bakteriobójcze działanie dopełniacza ma charakter wieloczynnikowy. Kwasy sjalowe są powszechnym składnikiem tkanek organizmów wyższych, jednocześnie są także rzadkim, ale istotnym składnikiem struktur bakteryjnych. Jako, że mikroorganizmy posiadające kwasy sjalowe w strukturach zewnętrznych są ludzkimi patogenami wskazuje fakt, iż kwas sjalowy zaangażowany jest w ich wirulencję. OMPs uczestniczą w procesie adhezji komórki bakterii do komórek gospodarza, są antygenami dla przeciwciał skierowanych przeciwko komórkom bakterii. OMPs umożliwiają także adaptację do środowiska i reagowanie na zmiany w nim zachodzące, zwiększając w ten sposób szansę na przetrwanie komórki bakterii w tym środowisku.

Piśmiennictwo

1. Achouak W., Heulin T., Pages J.M.: Multiple faces of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 1–7 (2001)
2. Adinolfi M., Zenthon J.: Complement in infant and maternal sera. *Rev. Perinatal. Med.* **5**, 61–65 (1983)
3. Barry G.T.: Colominic acid, a polymer of *N*-acetylneuraminic acid. *J. Exp. Med*. **107**, 507–521 (1958)
4. Bayer M.E.: Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol*. **53**, 395–404 (1968)
5. Bliska J.B., Falkow S.: Bacterial-resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Nat,. Acad. Sci. USA*, **8**, 3561–3565 (1992)
6. Bugla G., Doroszkiewicz W., Gamian A., Korzeniowska-Kowal A.: Bakteriobójcza aktywność surowicy ludzkiej wobec pałeczek gramujemnych posiadających w strukturze lipopolisacharydu kwas sjalowy. *Med. Dośw. Mikrob*. **56**, 25–261 (2004)
7. Bugla-Płoskońska G., Doroszkiewicz W.: Bactericidal activity of normal bovine serum (NSB) directed against some *Enterobacteriaceae* with sialic acid-containing lipopolysaccharides (LPS) as a component of cell wall. *Pol. J. Microbiol*. **55**, 169–174 (2006)
8. Bugla-Płoskońska G., Cisowska A., Karpińska K., Jankowski S., Doroszkiewicz W.: The mechanisms of the activation of normal human serum complement by *Escherichia coli* strains with K1 surface antigen. *Folia Mikrobiol.* **51**, 627–632 (2006)
9. Bugla-Płoskońska G., Futoma-Kołoch B., Doroszkiewicz W: Właściwości i funkcje biologiczne białek błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. *Post. Microbiol.* **46**, 139–152 (2007)
10. Cole L.E., Kawula T.H., Toffer K.L., Elkins C.: The *Haemophilus ducreyi* serum resistance antigen DsrA confers attachment to human keratinocytes. *Infect. Immun*. **11**, 6158–6165 (2002)
11. Cross A.S., Kim K.S., Wright D.C., Sadoff J.C., Gemski P.: Role of lipopolysaccharide and capsule in the serum resistance of bacteremic strains of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis*. **154**, 497–499 (1986)
12. Dimitriev B.: Towards a comprehensive view of the bacteriall cell wall. *Trends Microbiol*. **12**, 569–574 (2005)
13. Fujinami R.S., Oldstone M.B.A., Wróblewska Z., Frankiel M.E., Koprowski H.: Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein on of *Herpes simplex* virus protein with human intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **80**, 2346–2350 (1983)
14. Galdiero F., Cipollaro de L'Ero G., Benedetto N., Galdiero M., Tufano M.A.: Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun*. **61**, 151–161 (1993)
15. Green D.W.: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin. Ther. Targets*. **1**, 1–19 (2002)
16. Holst O., Brade H.: Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. Molecular Biochemistry and Cellular Biology, Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, vol. 1, CRC Press, Boca Raton: FI 135–170 (1992)
17. Jann K., Jann B.: Bacterial polysaccharide antigens. (w:) Surface carbohydrates of the procaryotic cell, red. I.W. Sutherland, Academic Press, London, 1977, s. 247–297
18. Jarvis G.A., Verdos N.A.: Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates of alternative complement pathway activation. *Infect. Immun*. **55**, 174–177 (1987)
19. Johnson J.R.: Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev*. **4**, 80–128 (1991)
20. Jones N.C., Osborn M.J.: Translocation of phospholipids between the outer and inner membranes of *Salmonella. typhimurium. J. Biol. Chem.* **252**, 7405–7412 (1977)
21. Kamińska W.: Wybrane czynniki zjadliwości uropetogennych szczepów *Escherichia coli*. *Post. Mikrobiol*. **4**, 357–374 (2001)
22. Kędzierska B.: N-Acetylneuraminic acid: a constituent of the lipopolysaccharide of *Salmonella toucra. Eur. J. Biochem.* **91**, 545–552 (1978)
23. Kleinschmidt J.H.: Folding kinetics of the outer membrane proteins OmpA and FomA into phospholipid bilayers. *Chem. Phys. Lipid*. **141**, 30–47 (2006)
24. Lazaron V.: Molecular biology of endotoxin antagonism. *World J. Surg*. **7**, 790–798 (2002)
25. Markiewicz Z.: Struktura i funkcje osłon bakteryjnych. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1993
26. Massari P., Ram S., Macleod H., Wetzler L.M.: The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol*. **2**, 87–93 (2003)
27. Mielnik G., Gamian A., Doroszkiewicz W.: Bactericidal activity of normal cord serum (NCS) against Gram-negative rods with sialic acid-containing lipopolysacchrides (LPS). *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. **31**, 169–173 (2001)
28. Mielnik G., Doroszkiewicz W., Korzeniowska-Kowal A.: Struktury zewnętrzne bakterii Gram-ujemnych a bakteriobójcza aktywność dopełniacza. *Post. Mikrobiol*. **1**, 39–57 (2004)
29. Nikaido H.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **63**, 593–656 (2003)
30. Pluschke G., Achtman M.: Degree of antibody-independent activation of the classical complement pathway by K1

Escherichia coli differs with O-antigen type and correlates with virulence of meningitis in newborns. *Infect. Immun*. **43**, 684–686 (1984)
31. Rietschel E.T., Kivikae T., Feist W., Loppnow H., Zabel P., Brade L.,Ulmer A.J., Brade H., Seydel U., Zahringer U., Schlaak M., Flad M.D., Schade U.: Molecular aspects of the chemistry and biology of endotoxins. Molecular aspects of inflammation. Springer-Verlag. 1991, s. 207–220
32. Roitt I., Brostoff J., Male D.: Immunologia. Wyd. Lekarskie PZWL, 2000
33. Różalski A.: Lipopolisacharydy (LPS) bakterii Gram-ujemnych – struktura chemiczna, aktywność biologiczna i znaczenie w chorobotwórczości. II. Budowa chemiczna a funkcje biologiczne LPS. *Post. Mikrobiol*. **3**, 317–337 (1995)
34. Różalski A.: Lipopolisacharydy (LPS) bakterii Gram-ujemnych, struktura chemiczna, aktywność biologiczna i znaczenie w chorobotwórczości. III. Lipopolisacharyd jako czynnik chorobotwórczości bakterii Gram-ujemnych. *Post. Mikrobiol*. **3**, 339–363 (1995)
35. Soulas C., Baussant T., Aubery J.P., Delneste Y., Barillat N., Caron G., Renno T., Bannefoy J.Y., Jeannin P.: Cutting edge: outer membrane protein A (OmpA) binds and activates human macrophages. *J. Immunol*. **165**, 2335–2340 (2000)
36. Spik G., Bayard B., Fournet B., Strecker G., Bouguelet S., Montreuil J: Studies on glycoconjugates. LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin. *FEBS Lett*. **50**, 296–299. (1975)
37. Tomas J.M., Ciurana B., Benedi V.J., Juarez A.: Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to non-immune serum. *J. Gen. Microbiol*. **134**, 1009–1016 (1988)
38. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevith R.J., Mathison J.C: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharides (LPS) and LPS binding protein. *Science*, **249**, 1431–1433 (1990)
39. Zipfel P.F., Würzner R., Skereka C.: Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol. Immunol*. **16**, 3850–3857 (2007)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 199–206
http://www.pm.microbiology.pl

CZYNNIKI ADHEZYJNE I INWAZYJNE UROPATOGENNYCH SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI* – PROBLEMATYKA INFEKCJI DRÓG MOCZOWYCH ORAZ MECHANIZMÓW PATOGENNOŚCI

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Beata Zalewska-Piątek*, Rafał Piątek, Józef Kur

[1]Katedra Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańsk,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, tel. (58) 347 18 62
* autor korespondencyjny: Beata Zalewska-Piątek, e-mail: beatazalewska1@o2.pl

1. Infekcje dróg moczowych wywoływane przez uropatogenne szczepy *E. coli*. 2. Biogeneza struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych. 3. Rodzina białek PapD-podobnych jako zakonserwowany element szlaku biogenezy polimerycznych struktur adhezyjnych. 4. Pilicydy jako specyficzne związki blokujące funkcję białek opiekuńczych rodziny PapD. 5. Adhezyny jako potencjalne szczepionki przeciwko uropatogennym szczepom *E. coli*. 6. Podsumowanie

Adhesive and invasive factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains – urinary tract infections and mechanisms of pathogenesis

Abstract: The urinary tract is a common site of bacterial infection, and *Escherichia coli* is by far the most common infecting agent at this site (80%). Surface virulence factors of pathogenic bacteria include various adhesive polymeric structures (pili/fimbriae) responsible for the recognition of specific cellular receptors. The interaction between adhesin and the selected receptor is a crucial step in pathogenesis. The most common adhesive structures of *E. coli* are type 1 pili and type P pili causing cystitis and pyelonephritis, respectively. The third group of *E. coli* adhesive factors (30–50% of cases of cystitis and 30% of cases of pyelonephritis in pregnant women and diarrhoea in infants) are adhesins belonging to the Dr family. The members of this family of adhesins are able to bind to human-decay accelerating factor (DAF) on the surface of urinary epithelial cells and promote DAF mobilization. The physiologic agent which enables a colonization of urinary tract by *E. coli* in pregnant women is the pregnancy. Pyelonephritis in pregnant women is a serious complication leading to bacteremia, urosepsis, acute respiratory distress syndrome and even death. The course of the pregnancy may be affected and may result in preterm labor and intrauterine growth retardation. The biogenesis of the adhesive polymeric structures is highly conserved among Gram-negative bacteria. Recently, compounds that inhibit pilus biogenesis and interfere with chaperone-subunit interactions have been discovered and termed pilicides. The pilicides target key virulence factors in pathogenic bacteria and thus are a promising cobdidate for developing drugs that would function by targeting virulence factors.

1. Urinary tract infections caused by uropathogenic *E. coli* strains. 2. Biogenesis of adhesive structures of Gram-negative bacteria. 3. Family of PapD-like proteins as a conserved element of bioassembly of polymeric adhesive structures. 4. Pilicides as specific compounds blocking the function of PapD family chaperones. 5. Adhesins as potential vaccines against uropathogenic *E. coli* strains. 6. Summary

Słowa kluczowe: adhezyna, inwazyna, uropatogenne szczepy *E. coli*, pilicydy
Key words: adhesin, invasin, uropathogenic *E. coli* strains, pilicides

1. Infekcje dróg moczowych wywoływane przez uropatogenne szczepy *E. coli*

Zakażenia dróg moczowych, są jednymi z najczęściej występujących schorzeń bakteryjnych u ludzi. Różnice w budowie anatomicznej układu moczowo-płciowego predysponują kobiety do większego narażenia na infekcje dróg moczowych, w porównaniu do mężczyzn. Uważa się, że prawie 30% kobiet i 12% mężczyzn przynajmniej kilka razy w życiu przechodzi zapalenie górnych lub dolnych dróg moczowych. W USA częstość występowania tego typu schorzeń szacuje się na 6 mln przypadków rocznie, zaś koszty leczenia przekraczają 1 mld dolarów w ciągu roku [20].

Najczęstszymi objawami klinicznymi zakażeń układu moczowego są: zapalenie pęcherza moczowego (związane z bolesnym i trudnym oddawaniem moczu, nagłą potrzebą oddawania moczu, bólem nadłonowym), odmiedniczkowe zapalenie nerek (towarzyszą powikłania w postaci bakteriemii prowadzącej czasami do posocznicy) oraz zapalenie gruczołu krokowego dotykające mężczyzn zwłaszcza w podeszłym wieku. W związku z powyższym profilaktyka i właściwe leczeń schorzeń dróg moczowych mogą przyczynić się do znacznego zmniejszenia wskaźników zachorowalności i obniżenia kosztów opieki medycznej. Stosowana terapia antybiotykowa jest skuteczna u większości pacjentów, a pojawiające się nawroty choroby związane są zwykle z ponownym zakażeniem bakteriami, które przedostały się poprzez cewkę moczową do pęcherza moczowego [16].

Jednym z mechanizmów obronnych komórek gospodarza przed zakażeniem dróg moczowych jest proces złuszczania zniszczonych i zainfekowanych przez

bakterie komórek nabłonkowych [15]. Proces ten jest bardzo podobny do apoptozy i obejmuje fragmentację DNA komórkowego oraz aktywację eznymów proteolitycznych zwanych kaspazami [16]. Po około sześciu godzinach od momentu zainfekowania organizmu, uruchomiony zostaje proces migracji komórek wykazujących aktywność fagocytarną (neutrofile, makrofagi) bezpośrednio do pęcherza moczowego, warstw komórek leżących w głębszych partiach nabłonka (urotelium) oraz nerek. Główną funkcją tych komórek jest zabijanie bakterii poprzez generowanie szkodliwych rodników tlenowych [7].

Proces złuszczania komórek nabłonkowych, migracja komórek fagocytarnych i produkcja czynników antybakteryjnych (rodniki tlenowe, tlenek azotu) stanowią wyzwanie dla uruchomienia przez bakterie uropatogenne mechanizmów warunkujących ich przeżywalność w świetle dróg moczowych. Mechanizmy te obejmują zdolność szczepów *E. coli* do dokonywania procesu inwazji komórek nabłonkowych wyścielających drogi moczowe, a jednocześnie uwalniania się z tych komórek przed zakończeniem procesu złuszczania. Warunkuje to dyspersję bakterii w obrębie dróg moczowych oraz stanowi ich zabezpieczenie przed mechanizmami obronnymi ze strony komórek gospodarza [16].

Infekcje układu moczowego w 80% przypadków wywoływane są przez uropatogenne szczepy *E. coli*, występujące również u ludzi zdrowych z prawidłowo funkcjonującym układem moczowym i odpornościowym. Większość zakażeń odbywa się drogą wstępującą, przez cewkę moczową do pęcherza moczowego lub z pęcherza moczowego przez przewody moczowe do nerek; czasami bakterie przemieszczają się z krwiobiegu do nerek [17].

Powierzchniowo eksponowane czynniki wirulentne uropatogennych szczepów *E. coli* obejmują hemolizyny (pełnią funkcje toksyn uszkadzających i destabilizujących błony komórkowe erytrocytów, leukocytów oraz endotelialnych i nabłonkowych komórek nerki), antygeny O (złożone z powtarzających się jednostek polisacharydowych stanowią element lipopolisacharydów) oraz struktury adhezyjne o określonej postaci morfologicznej (występują w formie pili, fimbrii lub otoczek białkowych opłaszczających komórki bakteryjne) [5, 21].

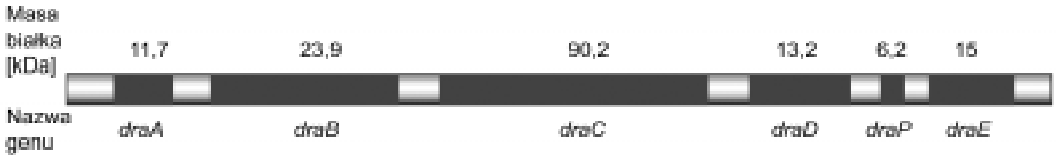
Struktury adhezyjne bakterii odpowiedzialne są za wysoce specyficzne rozpoznawanie receptorów znajdujących się na powierzchni ludzkich komórek. Specyficzna interakcja pomiędzy adhezyną a receptorem stanowi kluczowy etap w procesie patogenezy. Najbardziej rozpowszechnionymi strukturami adhezyjnymi uropatogennych szczepów *E. coli* są pile typu 1 i pile typu P. Pierwsze z nich są odpowiedzialne za wywoływanie zapalenia pęcherza moczowego, drugie powodują odmiedniczkowe zapalenie nerek. Specyficznym receptorem dla pili typu 1 są reszty mannozy, natomiast pile typu P wchodzą w interakcje z resztami Galα(1,4)Gal zlokalizowanymi w warstwie glikolipidowej nabłonka wyścielającego drogi moczowe [30, 31].

Trzecią, co do wielkości grupą czynników adhezyjnych uropatogennych szczepów *E. coli* są adhezyny rodziny Dr, dla których receptorem komórkowym jest białko DAF (ang. decay-accelerating factor), odgrywające również rolę w procesie hamowania klasycznej drogi aktywacji układu dopełniacza. Ze względu na obecność białka DAF na powierzchni erytrocytów szczepy *E. coli* rodziny Dr wykazują zdolność do procesu hemaglutynacji [19]. Bakterie *E. coli* z powierzchniową ekspozycją struktur adhezyjnych rodziny Dr wywołują wiele chorób, wśród których wyróżnić można odmiedniczkowe zapalenie nerek (30%), zapalenie pęcherza moczowego (30–50%), przewlekłe biegunki u dzieci (50%) i nawracające infekcje u młodych kobiet (10–15%). Fizjologicznym czynnikiem ułatwiającym zakażenie dróg moczowych u kobiet jest ciąża. Zwiększona produkcja progesteronu (wytwarzanego przez łożysko i ciałko żółte) w czasie ciąży stymuluje wzrost ekspresji receptora DAF, co z jednej strony chroni płód przed cytotoksycznym działaniem dopełniacza, zaś z drugiej warunkuje wzrost liczby receptorów komórkowych dla baterii *E. coli* rodziny Dr. W ten sposób możliwy jest proces adhezji i kolonizacji komórek nabłonkowych dróg moczowych, zwłaszcza nerek przez komórki bakteryjne [4, 20]. Odmiedniczkowe zapalenie nerek u kobiet ciężarnych prowadzi do wielu powikłań mających wpływ na przebieg ciąży (opóźnienie rozwoju płodu, uszkodzenie nerek, obniżenie masy ciała płodu, przedwczesny poród) [20].

2. Biogeneza struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych

Ze względu na kluczową rolę multimerycznych struktur adhezyjnych w procesie kolonizacji określonych tkanek i komórek gospodarza przez bakteryjne szczepy patogenne, mechanizm biogenezy tych struktur jest bardzo silnie zakonserwowany wśród wszystkich baterii Gram-ujemnych. Zakonserwowanie dotyczy zarówno organizacji genetycznej operonu kodującego całą maszynerię białkową odpowiedzialną za tworzenie struktur adhezyjnych (zewnątrzbłonowe białka kanałowe, białka opiekuńcze), jak i sekwencji aminokwasowej oraz struktury poszczególnych białek tego szlaku. System sekrecji określany jako „białko opiekuńcze-zewnątrzbłonowe białko kanałowe" (chaperone-usher pathway) wykorzystywany jest w procesie biogenezy około 30 różnych struktur zewnątrzkomórkowych o właściwościach adhezyjnych (struktury pilowe/fimbrialne i afimbrialne) [27].

Fimbrie Dr kodowane przez operon *dra* są strukturami homopolimerycznymi (o średnicy ok. 2 nm) zbudowanymi z podjednostek białkowych DraE, w przeci-



Rys. 1. Schemat operonu *dra* kodującego fimbrie typu Dr (opis w tekście)

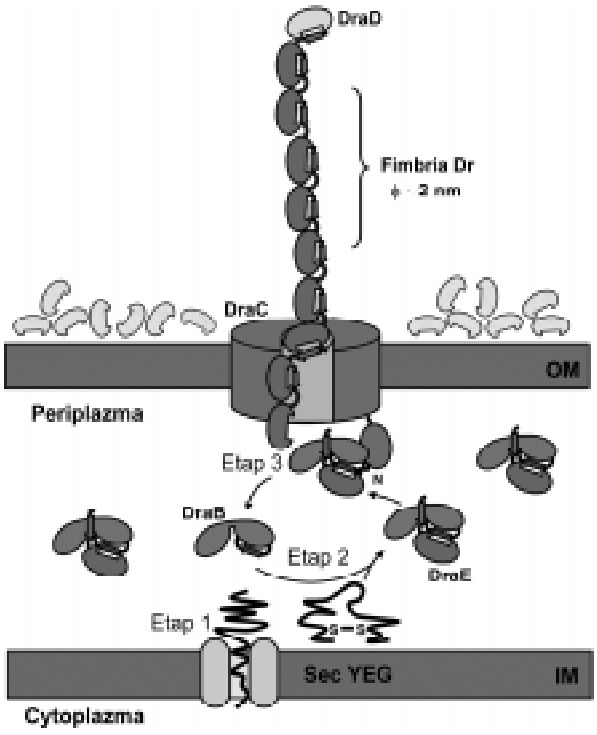
wieństwie do heteropolimerycznych układów pilowych (o średnicy ok. 7 nm) kodowanych przez operony *fim* (pile typu 1) i *pap* (pile typu P). Fimbrie Dr, kodowane przez chromosomalnie zlokalizowany operon *dra*, zostały po raz pierwszy zidentyfikowane w szczepie *E. coli* O75:K5:H$^-$ izolowanym z odmiedniczkowego zapalenia nerek [2]. W obrębie operonu *dra* zidentyfikowano i scharakteryzowano sześć otwartych ramek odczytu: *draA*, *draB*, *draC*, *draD*, *draP* i *draE* [19] (Rys. 1).

Białko DraE stanowiące element strukturalny fimbrii Dr równocześnie pełni funkcję adhezyjną poprzez rozpoznawanie receptora DAF, zlokalizowanego na powierzchni komórek nabłonkowych i erytrocytów [35]. Na szczycie fimbrii Dr znajduje się białko inwazyny DraD (wykazujące również zdolność do tworzenia bezpośrednio na powierzchni komórek bakteryjnych otoczki białkowej niezależnej od struktur fimbrialnych) (Rys. 2) specyficznie oddziaływujące z białkiem integryny $\alpha_5\beta_1$ i w ten sposób stymulujące proces inwazji komórek bakteryjnych do wnętrza komórek nabłonkowych górnych dróg moczowych [33]. Białko DraB jest periplazmatycznym białkiem opiekuńczym specyficznie zaangażowanym w proces składania podjednostek adhezyjnych DraE. Białko DraC tworzy homooligomeryczny kanał w błonie zewnątrzkomórkowej bakterii, poprzez który odbywa się proces polimeryzacji podjednostek białkowych DraE w strukturę fimbrialną. Białka DraA i DraP są odpowiedzialne za regulację procesu transkrypcji operonu *dra* [22, 23]. Bardzo specyficzną własnością fimbrii Dr jest ich zdolność do wiązania drugiego receptora – kolagenu typu IV (poprzez domenę 7S bogatą w reszty aminokwasowe Cys i Lys), składnika błony podstawnej tkanki nabłonkowej [32]. Ta własność, specyficzna tylko dla adhezyny DraE w obrębie całej rodziny adhezyn Dr powoduje, że szczepy *E. coli* Dr$^+$ po dokonaniu inwazji komórek nabłonkowych są bardzo trudne do wyeliminowania przez układ odpornościowy zainfekowanego organizmu oraz stosowaną terapię antybiotykową. Szczepy te są klasycznym przykładem bakterii prowadzących do przewlekłego odmiedniczkowego zapalenia nerek [4].

Wszystkie białka strukturalne zaangażowane w biogenezę fimbrii Dr syntetyzowane są w cytoplazmie wraz z sekwencjami sygnalnymi. Następnie podlegają one transportowi do przestrzeni periplazmatycznej na drodze Sec-zależnej, podczas którego zlokalizowana w błonie wewnętrznej sygnalna peptydaza Sec odcina sekwencję sygnalną [23] (Rys. 2).

Białko fimbrialne DraE, po przetransportowaniu do periplazmy, ulega niespecyficznemu wbudowaniu w błonę cytoplazmatyczną za pośrednictwem eksponowanych powierzchniowo hydrofobowych reszt aminokwasowych. Wszystkie podjednostki będące elementem budulcowym struktur polimerycznych (pile/fimbrie, afimbrialna otoczka) powstające na drodze „białko opiekuńcze – zewnątrzbłonowe białko kanałowe" posiadają strukturę immunoglobulino-podobną (Ig-podobną). Klasyczna struktura immunoglobulinowa jest spłaszczoną beczką zbudowaną z 7 anty-równoległych β-harmonijek (oznaczanych od βA do βG). W przypadku podjednostek struktur adhezyjnych mamy do czynienia ze strukturą Ig-podobną, która posiada tylko 6 ułożonych anty-równolegle β-harmonijek (brakuje β-harmonijki G). W efekcie, podjednostki strukturalne nie są w stanie spontanicznie uzyskać stabilnej struktury immunoglobulinowej (Etap 1) [22, 24] (Rys. 2).

Periplazmatyczne białko opiekuńcze DraB poprzez specyficzne interakcje z podjednostkami fimbrialnymi DraE tworzy w periplazmie kompleksy, które są właściwym substratem w procesie formowania fimbrii



Rys. 2. Biogeneza fimbrii Dr według zakonserwowanego mechanizmu „białko opiekuńcze-zewnątrzbłonowe białko kanałowe" uropatogennych szczepów *E. coli* (opis w tekście)

Dr (reakcja tworzenia kompleksu DraB-DraE nosi nazwę komplementacji nici). W wyniku formowania tego kompleksu następuje proces składania białka adhezyny DraE do postaci zdolnej do procesu polimeryzacji. Białko DraB posiada specyficzną β-harmonijkę donorową G1, która w trakcie tworzenia kompleksu z podjednostką adhezyjną uzupełnia jej Ig-podobną strukturę. W efekcie tego procesu podjednostka fimbrialna zyskuje stabilną strukturę Ig składającą się z 7 anty-równoległych β-harmonijek. β-harmonijka donorowa białka opiekuńczego oddziałuje bezpośrednio z C-terminalną akceptorową β-harmonijką F podjednostki (Etap 2) [22] (Rys. 2).

Utworzony w periplazmie kompleks DraB-DraE migruje do zlokalizowanego w błonie zewnętrznej białka kanałowego DraC. Tam, w specyficznym środowisku tworzonym przez białko DraC następuje proces polimeryzacji kolejnych podjednostek DraE w strukturę fimbrialną. W procesie tworzenia polimeru bierze udział nieustrukturyzowana N-terminalna nić białka podjednostkowego, swobodnie „wystająca" ze struktury Ig podjednostki i wypierająca białko opiekuńcze z oddziaływania z drugą podjednostką fimbrialną, znajdującą się z nim w kompleksie [18]. W efekcie struktura Ig podjednostki fimbrialnej zostaje uzupełniona przez N-terminalną sekwencję pochodzącą z innej podjednostki poprzez mechanizm donorowej wymiany nici, pełniąc dokładnie tę samą funkcję, co donorowa β-harmonijka G1 białka opiekuńczego (Etap 3) [24, 30, 31].

Białko DraD, podobnie jak inne białka budujące struktury polimeryczne, posiada klasyczną strukturę Ig-podobną zbudowaną z 6 β-harmonijek ułożonych anty-równolegle. W strukturze tej widoczna jest charakterystyczna szczelina akceptorowa mogąca ulegać donorowaniu przez N-terminalną nić donorową pochodzącą z białka DraE. Białko DraD, w przeciwieństwie do adhezyny DraE, nie posiada sekwencji odpowiadającej N-terminalnej nici donorowej. W efekcie tego może być zlokalizowane tylko i wyłącznie na szczycie fimbrii zbudowanej z białek podjednostkowych DraE. Nie wyklucza to jednak możliwości lokalizacji białka DraD na szczycie fimbrialnego polimeru Dr bezpośrednio na powierzchni komórek bakteryjnych [11]. Natywne białko DraD syntetyzowane jest w cytoplazmie wraz z sekwencją sygnalną, dzięki której następuje jej transport do przestrzeni periplazmatycznej poprzez system Sec, a następnie sekrecja przez błonę zewnętrzną na powierzchnię komórki poprzez białko GspD (szlak sekrecji typu II). Być może, zakończenie polimeru białkowego zbudowanego z podjednostek fimbrialnych DraE przez inwazynę DraD, już po przetransportowaniu na powierzchnię komórki, odgrywa szczególną rolę w procesie przeżycia bakterii po zainfekowaniu komórek gospodarza.

W przypadku wszystkich opisanych dotychczas struktur adhezyjnych powstających na drodze „białko opiekuńcze-zewnątrzbłonowe białko kanałowe" proces tworzenia zewnątrzkomórkowego polimeru odbywa się zawsze według tego samego modelu (przedstawiony dla fimbrii Dr) [26]. Najwyższy poziom zakonserwowania w tym modelu wykazują białka opiekuńcze i zewnątrzbłonowe białka kanałowe, stanowiące maszynerię białkową odpowiedzialną za przeprowadzenie procesu biogenezy. Natomiast podjednostki adhezyjne stanowiące element strukturalny układów polimerycznych wykazują zdecydowanie większe zróżnicowanie sekwencyjne, jednak zawsze zostaje zachowana struktura Ig-podobna.

3. Rodzina białek PapD-podobnych jako zakonserwowany element szlaku biogenezy polimerycznych struktur adhezyjnych

Rodzina białek PapD-podobnych odgrywa kluczową rolę w procesie biogenezy adhezyjnych struktur polimerycznych bakterii Gram-ujemnych (przyjmowanie struktury natywnej przez podjednostki pilowe/fimbrialne, uwalnianie podjednostek z błony wewnętrznej oraz ich zabezpieczenie przed nieukierunkowaną polimeryzacją w periplazmie) zachodzącym według zakonserwowanego systemu „periplazmatyczne białko opiekuńcze-zewnątrzbłonowe białko kanałowe". Białka te charakteryzują się wysokim poziomem homologii zarówno sekwencyjnej, jak i strukturalnej. Wszystkie PapD-podobne białka opiekuńcze wykazują strukturę w kształcie bumerangu (litera L) złożoną z dwóch globularnych domen. Reszty aminokwasowe odgrywające w tych białkach istotne funkcje strukturalne (stabilizacja struktury), jak i funkcjonalne (oddziaływania z podjednostkami struktury polimerycznej) są silnie zakonserwowane [9, 22, 25].

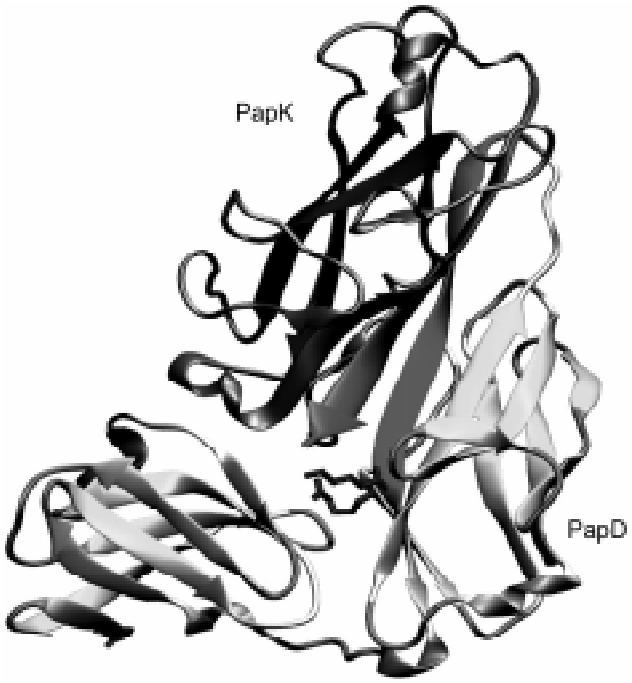
Białko opiekuńcze PapD, kodowane przez operon *pap* uropatogennych szczepów *E. coli*, stanowi modelowy przykład periplazmatycznego białka opiekuńczego rodziny PapD, kontrolującego proces biogenezy pili typu P. W strukturze tego białka wyróżnić można dwie globularne domeny (domena N- i C-terminalna), których wzajemna orientacja powoduje nadanie białku kształtu bumerangu [9]. Badania z wykorzystaniem mutagenezy ukierunkowanej wykazały obecność w obrębie domeny N-terminalnej białka PapD reszt aminokwasowych (zwłaszcza Arg8 i Lys112 w obrębie C-końca β-harmonijki donorowej G1) niezbędnych w procesie tworzenia kompleksów z podjednostkami pilowymi. Reszty aminokwasowe Arg8 i Lys112 znajdują się w szczelinie białka opiekuńczego w bardzo bliskim sąsiedztwie tworząc region – „kotwicę" o silnym ładunku dodatnim (Rys. 3). Region ten odpowiedzialny jest za oddziaływanie z grupą karboksylową β-harmonijki akceptorowej F podjednostki pilowej. W obrębie utworzonego w ten sposób kompleksu biał-

ko opiekuńcze-podjednostka pilowa następuje zwinięcie podjednostki do formy natywnej zdolnej do procesu polimeryzacji. Skierowane do wnętrza szczeliny reszty hydrofobowe β-harmonijki donorowej G1 białka opiekuńczego stabilizują strukturę Ig podjednostki pilowej poprzez oddziaływanie z resztami hydrofobowymi rdzenia podjednostki, występującymi głównie w obrębie β-harmonijki akceptorowej F [25]. C-terminalna domena białka opiekuńczego jest w zdecydowanie mniejszym stopniu zaangażowana w proces oddziaływań z podjednostką pilową, w porównaniu do domeny N-terminalnej.

Rodzinę białek PapD-podobnych, ze względu na różnicę w długości pętli aminokwasowej łączącej β-harmonijkę F1 z β-harmonijką donorową G1 w domenie N-terminalnej, można podzielić na dwie podrodziny: FGS (ang. F1-G1 short) i FGL (ang. F1-G1 long). Podrodzina FGS obejmuje białka opiekuńcze, które posiadają pętlę od długości 10–20 reszt aminokwasowych, natomiast podrodzina FGL to białka opiekuńcze zawierające pętlę o długości 21 do 29 reszt aminokwasowych [3, 10]. Stwierdza się występowanie korelacji pomiędzy strukturą układu adhezyjnego a podrodziną, do której należy białko opiekuńcze ogrywające rolę w powstawaniu danego układu polimerycznego. Białka opiekuńcze podrodziny FGS biorą udział w biogenezie pili o wyraźnej ustrukturyzowanej formie (pile typu 1 i typu P). W przeciwieństwie do podrodziny FGS, białka podrodziny FGL warunkują proces formowania układów adhezyjnych o strukturze fimbrialnej lub afimbrialnej (fimbrie Dr, afimbrialna otoczka Afa). Proces powstawania różnego typu układów adhezyjnych związany jest ze specyficznym charakterem oddziaływań pomiędzy białkiem opiekuńczym, a układem reszt hydrofobowych zlokalizowanych w obrębie C-terminalnej β-harmonijki akceptorowej F podjednostek pilowych/fimbrialnych. W związku z tym białka opiekuńcze podrodziny FGS (PapD, FimC, SfaE) wchodzą w interakcje z podjednostkami pilowymi charakteryzującymi się obecnością w pozycjach 4, 6, 8 reszt hydrofobowych, a w pozycji 14 reszty aminokwasowej Gly (numeracja od C-końca białka podjednostkowego). Białka podrodziny FGL (DraB, Caf1M) oddziałują z podjednostkami pilowymi posiadającymi C-terminalną sekwencję charakteryzującą się obecnością reszt hydrofobowych w pozycjach 6 i 8 oraz resztą aminokwasową Gly w pozycji 14 [10] (Rys. 4).

4. Pilicydy jako specyficzne związki blokujące funkcję białek opiekuńczych rodziny PapD

W chwili obecnej brak jest chemioterapeutyków, które zwalczałyby infekcje dróg moczowych specyficznie, poprzez blokowanie szlaku biogenezy bakteryjnych struktur adhezyjnych typu „białko opiekuńcze-zewnątrzbłonowe białko kanałowe". Pilicydy stanowią całkowicie nową grupę potencjalnych chemoterapeutyków, dla których celem molekularnym są silnie zakonserwowane białka opiekuńcze szlaku „białko opiekuńcze-zewnątrzbłonowe białko kanałowe" [6, 29]. Leki te w wyniku specyficznych interakcji z białkiem opiekuńczym warunkowałyby zablokowanie powstawania polimerycznych struktur adhezyjnych. Tym samym zniesiony zostałby krytyczny etap w procesie patogenezy uropatogennych szczepów *E. coli* – oddziaływanie pomiędzy komórka bakteryjną a komórką gospodarza. W przypadku dróg moczowych bakterie z zablokowanym systemem biogenezy układu adhezyjnego byłyby wydalane wraz ze strumieniem przepływającego moczu.



Rys. 3. Model struktury krystalograficznej kompleksu białko opiekuńcze PapD-podjednostka pilowa PapK.

W strukturze podjednostki PapK kolorem jasno szarym zaznaczono C-terminalną β-harmonijkę akceptorową F. W szczelinie pomiędzy domenami białka PapD wyeksponowano przy użyciu modelu patyczkowego (kolor ciemno szary) reszty Arg8 i Lys112, stanowiące dodatnio naładowaną „kotwicę" oddziałującą z grupą karboksylową β-harmonijki F podjednostki. W strukturze białka opiekuńczego PapD kolorem jasno szarym zaznaczono β-harmonijkę donorową G1 w obrębie domeny N-terminalnej.

Analiza strukturalna białek rodziny PapD wykazała, iż najbardziej zakonserwowanym oraz funkcjonalnie newralgicznym elementem budowy wszystkich tych białek jest dodatnio naładowana „kotwica" Arg-Lys biorąca udział w dokowaniu podjednostek adhezyjnych (Rys. 3). Obecnie prowadzone są badania nad pilicydami specyficznie blokującymi funkcję biologiczną białek opiekuńczych PapD i FimC, odgrywających rolę w procesie biogenezy pili typu P i typu 1. Punktem wyjścia dla prowadzonych badań były struktury krystalograficzne powyższych białek opiekuńczych z peptydami odpowiadającymi sekwencją C-terminalnej

A. Analiza porównawcza sekwencji C-terminalnycj β-harmonijek akceptorowych podjednostek pilowych tworzących kompleksy z białkami opiekuńczymi podrodziny FGS.

```
                14  12       8   6   4   2
PapG....K P G E L S G S M T M V L S F P-COOH
PapF....N G G D F Q T T A S M S M I Y N-COOH
PapE....I A G P F S A T A T L V A S Y S-COOH
PapK....V P G D Y E A T A T F E L T Y R-COOH
PapA....T E G A F S A V A N F N L T Y Q-COOH
PapH....E A G N Y F A V L G F R V D Y E-COOH
Sfa5....T P G N I S S V I T V T Y T Y A-COOH
FimH....T A G N V Q S I I G V T F V Y Q-COOH

FimA....T P G A A N A D A T F K V Q Y Q-COOH
F17A....T A G D V T S T V N Y T I A Y Q-COOH
MrkD....S T G K V K S H L V F N L T Y H-COOH
```

B. Analiza porównawcza sekwencji C-terminalnycj β-harmonijek akceptorowych podjednostek pilowych tworzących kompleksy z białkami opiekuńczymi podrodziny FGL.

```
              14          8   6
MyfA....K A G E Y Q F T G R V E E Y V E-COOH
CssA....P P G I Y N D Q V M V G Y Y V N-COOH
CssB....S S G I Y A G H L T Y S V Y S N-COOH
DraE....P P G N Y T L T L T G G Y V A K-COOH
AggA....I P G E Y R M I L H A G I N F  -COOH
DraE....P P G N Y T L T L T G G Y V A K-COOH
```

Rys. 4. Analiza porównawcza sekwencji C-terminalnych β-harmonijek akceptorowych podjednostek pilowych. Kolorem jasno szarym zaznaczono reszty hydrofobowe [10]

β-harmonijce F podjednostek pilowych lub też kompleksów podjednostka pilowa-białko opiekuńcze. Uzyskane struktury krystalograficzne dają precyzyjny obraz interakcji zachodzących pomiędzy podjednostką pilową a białkiem opiekuńczym. Na bazie tych struktur zaprojektowane zostały związki będące analogami strukturalnymi peptydu pilowego zakotwiczonego w rejonie dodatnio naładowanej kotwicy Arg-Lys oraz donorowej β-harmonijki G1 białka opiekuńczego [1, 8, 29]. Analizie poddane zostały związki będące pochodnymi 2-pirydonu i tyrozyny. Projektowane związki posiadają grupę karboksylową niezbędną do oddziaływania z dodatnio naładowaną „kotwicą" Arg-Lys białek opiekuńczych oraz układ grup hydrofobowych będących analogami reszt hydrofobowych β-harmonijki akceptorowej F podjednostki pilowej (miejsce oddziaływania z β-harmonijką donorową G1 białka opiekuńczego). Spośród 10 przebadanych związków, cztery z nich wykazywały największe powinowactwo do białek opiekuńczych PapD i FimC oraz zdolność do specyficznej dysocjacji kompleksów podjednostka pilowa-białko opiekuńcze [8].

5. Adhezyny jako potencjalne szczepionki przeciwko uropatogennym szczepom *E. coli*

Adhezyny bakteryjne będące elementem strukturalnym układów polimerycznych (pile/fimbrie) są czynnikiem warunkującym zdolność bakterii do specyficznej interakcji (adhezji) z receptorami zlokalizowanymi na powierzchni komórek gospodarza, czego efektem jest kolonizacja określonych komórek i tkanek oraz zakażenie. Stwierdzono, że pewne fragmenty struktury białkowej adhezyn są szczególnie immunogenne (regiony immunodominujące). Regiony te występują najczęściej w okolicach pętli polipeptydowych pozbawionych sztywnej struktury [36].

Cechą charakterystyczną adhezyjnych struktur powierzchniowych jest ich zmienność antygenowa stanowiąca jeden z mechanizmów obronnych komórek bakteryjnych przed układem odpornościowym komórek infekowanego organizmu. Związane jest to ze zdolnością do wyrażania kilku różnych wariantów antygenowych składnika komórki przez pojedynczy szczep bakteryjny [14]. Podjednostki strukturalne charakteryzują się również dużą zmiennością sekwencji aminokwasowej. Otrzymane wyniki doświadczeń związane z brakiem reakcji krzyżowej z przeciwciałami skierowanymi przeciwko adhezynie DraE oraz adhezynie DraE-II potwierdzają zróżnicowanie antygenowe w obrębie adhezyn rodziny Dr, które ma odbicie w ograniczonej homologii sekwencji aminokwasowej analizowanych adhezyn (stopień homologii 20%). W związku z tym otrzymane w wyniku immunizacji przeciwciała skierowane przeciwko określonej adhezynie będą wykazywały ograniczoną funkcję ochronną organizmu gospodarza przed innymi spokrewnionymi adhezynami (w omawianym przypadku adhezynami

rodziny Dr). Dlatego też próby wykorzystania podjednostek adhezyjnych jako celu molekularnego w badaniach nad szczepionkami powinny być skoncentrowane na poszukiwaniu zakonserwowanych determinant antygenowych w strukturze białek adhezyjnych [21].

Ze względu na silne właściwości immunogenne struktur pilowych/fimbrialnych oraz ich występowanie na powierzchni komórek bakteryjnej w dużej ilości (ok. 500 kopii/komórkę) zastosowanie szczepionek zawierających główne składniki immunodominujące podjednostek adhezyjnych może być jednym ze sposobów zapobiegania infekcjom bakteryjnym. Przeprowadzone doświadczenia na zwierzętach wykazały, że immunizacja oczyszczonymi preparatami fimbrialnymi wywołuje odpowiedź humoralną, co świadczy o ich immunogenności. Badania potwierdzają również bezpieczeństwo tego typu szczepionek, których podawanie nie niesie ryzyka wywołania choroby [14].

Możliwość zastosowania szczepionek pilowych/fimbrialnych w nieco innym aspekcie potwierdziły wyniki badań oparte na oczyszczonym kompleksie adhezyny FimH (zlokalizowanej na szczycie pili typu 1) i białka opiekuńczego FimC (kodowanych przez operon *fim*) otrzymane na modelu zwierzęcym (w postaci emulsji z adjuwantem Freund'a) oraz w doświadczeniach *in vitro*. Myszy C3H/HeJ immunizowane kompleksem białkowym FimCH wykazywały wysoki poziom przeciwciał IgG przez okres jednego roku. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że przeciwciała skierowane przeciwko adhezynie FimH skutecznie blokują zdolność uropatogennych szczepów *E. coli* zawierających operon *fim* do adhezji z komórkami nabłonkowymi pęcherza moczowego (poprzez interakcje z powierzchniowo zlokalizowanymi resztami mannozy) [13]. Obiecujące wyniki otrzymano również po zastosowaniu tego samego kompleksu białkowego w odniesieniu do małp. Badaniom poddano 8 małp, z których 4 otrzymały kompleks FimCH w odstępie 4 tygodni, natomiast reszcie zwierząt podano śródskórnie tylko roztwór samego adjuwanta. Następnie wszystkie małpy zainfekowano szczepami *E. coli fim*$^+$ wywołującymi zapalenie pęcherza moczowego. 3 spośród 4 zaszczepionych małp nie wykazywały objawów zapalenia pęcherza moczowego, co potwierdza skuteczność zastosowanej szczepionki FimCH. W przeciwieństwie do małp immunizowanych kompleksem FimCH, małpy kontrolne wykazywały objawy choroby [13].

Odmiennym aspektem wykorzystania podjednostek strukturalnych pili/fimbrii jest ich zastosowanie jako nośników peptydowych determinant antygenowych pochodzenia bakteryjnego lub wirusowego [12]. Elementem ograniczającym jest wielkość determinanty antygenowej, która nie może zaburzać struktury adhezyny w takim stopniu, aby uniemożliwić jej polimeryzację w strukturę pili/fimbrii. Z tego względu miejscem insercji heterologicznych epitopów są zazwyczaj sekwencje występujące na zewnątrz struktury białka (zabezpieczające strukturę hydrofobowego rdzenia) [33, 34].

Geny kodujące adhezyny bakteryjne mogą być również wykorzystane do otrzymywania szczepionek DNA. W tym celu należy wykorzystać całą sekwencję białka adhezyny lub tylko sekwencję kodującą fragment polipeptydowy stanowiący epitopy rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego. Istnieje również możliwość zastosowania kombinacji kilku genów kodujących determinanty antygenowe adhezyn. Korzystnym aspektem stosowania tego typu szczepionek jest potencjalna możliwość wywołania trwałej odpowiedzi immunologicznej, zarówno humoralnej, jak i komórkowej [36].

6. Podsumowanie

Zakażenia dróg moczowych są szeroko rozpowszechnione. Większość tych infekcji wywołują uropatogenne szczepy *E. coli*. Wirulencja tych szczepów warunkowana jest głównie przez powierzchniowo zlokalizowane struktury adhezyjne (o określonej postaci morfologicznej – fimbrie, pile, otoczki) odpowiedzialne za rozpoznawanie specyficznych receptorów komórkowych. Interakcja pomiędzy adhezyną a odpowiednim receptorem stanowi najistotniejszy etap w procesie patogenezy. Silne właściwości immunogenne polimerycznych struktur adhezyjnych wykorzystywane są coraz częściej do konstrukcji szczepionek opartych na zakonserwowanych determinantach antygenowych adhezyn.

Ze względu na kluczową rolę struktur adhezyjnych w procesie kolonizacji określonego środowiska przez dany szczep bakteryjny, mechanizm biogenezy tych struktur jest bardzo silnie zakonserwowany pośród wszystkich bakterii Gram ujemnych. Szczegółowa charakterystyka białek opiekuńczych szlaku „białko opiekuńcze-zewnątrzbłonowe białko kanałowe" wykazała, że mogą być one wykorzystane jako znakomity cel molekularny dla potencjalnych leków. Leki takie, poprzez specyficzne oddziaływanie z białkiem opiekuńczym, uniemożliwiałyby powstawanie struktur adhezyjnych z równoczesnym zablokowaniem procesu adhezji i inwazji komórek bakteryjnych do wnętrza komórek infekowanego organizmu.

Piśmiennictwo

1. Aberg V., Hedenström M., Pinkner J.S., Hultgren S.J., Almqvist F.: C-Terminal properties are important for ring-fused 2-pyridones that interfere with the chaperone function in uropathogenic *E. coli*. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 3886–3892 (2005)
2. Carnoy C., Moseley S.L.: Mutational analysis of receptor binding mediated by the Dr family of *Escherichia coli* adhesins. *Mol. Microbiol.* **23**, 365–379 (1997)

3. Chapman D.A., Zavialov A.V., Chernovskaya T.V., Karlyshev A.V., Zav'yalova G.A., Vasiliev A.M., Dudich I.V., Abramov V.M., Zav'yalov V.P., MacIntyre S.: Structural and functional significance of the FGL sequence of the periplasmic chaperone Caf1M of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **181**, 2422–2429 (1999)
4. Connolly A., Throp J.M. Jr.: Urinary tract infections in pregnancy. *Urol. Clin. North. Am.* **26**, 779–787 (1999)
5. Emody L., Kerényi M., Nagy G.: Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2**, 29–33 (2003)
6. Emtenäs H., Alderin L., Almqvist F.: An enantioselective ketene-imine cycloaddition method for synthesis of substituted ring-fused 2-pyridinones. *J. Org. Chem.* **66**, 6756–6761 (2001)
7. Haraoka M., Hang L., Frendéus B., Godaly G., Burdick M., Strieter R., Svanborg C.: Neutrophil recruitment and resistance to urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* **180**, 1220–1229 (1999)
8. Hedenström M., Emtenäs H., Pemberton N., Aberg V., Hultgren S.J., Pinkner J.S., Tegman V., Almqvist F., Sethson I., Kihlberg J.: NMR studies of interactions between periplasmic chaperones from uropathogenic *E. coli* and pilicides that interfere with chaperone function and pilus assembly. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 4193–4200 (2005)
9. Holmgren A., Bränden C.I.: Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature*, **342**, 248–251 (1989)
10. Hung D.L., Knight S.D., Woods R.M., Pinkner J.S., Hultgren S.J.: Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones. *EMBO J.* **15**, 3792–3805 (1996)
11. Jędrzejczak R., Dauter Z., Dauter S., Piątek R., Zalewska B., Mróz M., Bury K., Kur J.: Structure of DraD invasin from uropathogenic *Escherichia coli*: a dimer with swapped betatails. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 157–164 (2006)
12. Klemm P., Schembrii M.A.: Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiol.* **12**, 3025–3032 (2000)
13. Langermann S., Ballou W.R. Jr.: Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *Escherichia coli* urinary tract infections. *J Infect. Dis.* **1**, S84–86 (2001)
14. Markiewicz Z. Struktura i funkcja osłon bakteryjnych. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1993, s. 220–232
15. McTaggart L., Rigby R., Elliot T.: The pathogenesis of urinary tract infections associated with *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* and *S. epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* **32**, 135–141 (1990)
16. Mulvey M.A., Schilling J.D., Martinez J.J., Hultgren S.J.: Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8829–8835 (2000)
17. Mühldorfer J., Ziebuhr W., Hacker J.: *Escherichia coli* in urinary track infection. (w:) Molecular Medical Microbiology, red. M. Sussman, Academic Press, London, 2001, s. 1739–1748
18. Normark, S.: Anfinsen comes out of the cage during assembly of the bacterial pilus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7670–7672 (2000)
19. Nowicki B., Selvarangan R., Nowicki S.: Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J. Infect. Dis.* **183**, S24–27 (2001)
20. Orłowski T. Choroby nerek. (w:) red. T. Orłowski, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1998
21. Pham T., Goluszko P., Popov V., Nowicki S., Nowicki B.J.: Molecular cloning and characterization of Dr-II, a nonfimbrial adhesin-I-like adhesin isolated from gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* that binds to decay-accelerating factor. *Infect. Immun*. **65**, 4309–4318 (1997)
22. Piątek R., Zalewska B., Bury K., Kur J.: The chaperone-usher pathway of bacterial adhesin biogenesis – from molecular mechanism to strategies of anti-bacterial prevention and modern vaccine design. *Acta Biochim. Pol.* **52**, 639–46 (2005a)
23. Piątek R., Zalewska B., Kolaj O., Ferens M., Nowicki B., Kur J.: Molecular aspects of biogenesis of *Escherichia coli* Dr fimbriae: characterization of DraB-DraE complexes. *Infect. Immun.* **73**, 135–145 (2005b)
24. Sauer F.G., Barnhart M., Choudhury D., Knight S.D., Waksman G., Hultgren S.J.: Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 548–556 (2000)
25. Sauer F.G., Futterer K., Pinkner J.S., Dodson K.W., Hultgren S.J., Waksman G.: Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science*, **285**, 1058–1061 (1999)
26. Sauer F.G., Remaut H., Hultgren S.J., Waksman G.: Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**, 259– 267 (2004)
27. Soto G., Dodson K., Ogg D., Liu Ch., Heuser J., Knight S., Kihlberg I., Jones C., Hultgren S.: Periplasmic chaperone recognition motif of subunit mediates quaternary interaction in the pilus. *EMBO J.* **17,** 6155–6167 (1998)
28. Svensson A., Fex T., Kihlberg J.: Preparation of fluorinated linkers: use of 19F NMR spectroscopy to establish conditions for solid-phase synthesis of pilicide libraries. *J. Comb. Chem.* **2**, 736–748 (2000)
29. Svensson A., Larsson A., Emtenas H., Hedenstrom M., Fex T., Hultgren S.J., Pinkner J.S., Almqvist F., Kihlberg J.: Design and evaluation of pilicides: potential novel antibacterial agents directed against uropathogenic *Escherichia coli*. *Chembiochem.* **2**, 915–918 (2001)
30. Thanassi D.G., Hultgren S.J.: Assembly of complex organelles: pilus biogenesis in gram-negative bacteria as a model system. *Methods*, **20**, 111–126 (2000)
31. Thanassi D.G., Hultgren S.J.: Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 420–430 (2000)
32. Westerlund B., Kuusela P., Risteli J., Risteli L., Vartio T., Rauvala H., Virkola R., Korhonen T.: The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. *Mol. Microbiol.* **3**, 329–337 (1989)
33. Zalewska B., Piątek R., Bury K., Samet A., Nowicki B., Nowicki S., Kur J.: A surface-exposed DraD protein of uropathogenic *Escherichia coli* bearing Dr fimbriae may be expressed and secreted independently from DraC usher and DraE adhesin. *Microbiol.* **151**, 2477–2486 (2005)
34. Zalewska B., Piątek R., Konopa G., Nowicki B., Nowicka S., Kur J.: Chimeric Dr fimbriae with a herpes simplex virus type 1 epitope as a model for a recombinant vaccine. *Infect. Immun.* **71**, 5505–5513 (2003)
35. Zalewska B., Stangret J., Bury K., Wojciechowski M., Kur J., Piątek R.: DAF- and collagen-binding properties of chimeric Dr fimbriae. *Microbiol.* **153**, 2733–2742 (2007)
36. Żeromski J. Immunologia. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 2000, s. 7.7–7.8.

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 207–213
http://www.pm.microbiology.pl

GDZIE WYSTĘPUJĄ PSYCHROFILE?

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Mieczysław K. Błaszczyk

Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Wydział Rolnictwa i Biologii SGGW
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, tel. (22) 593 26 34, e-mail: mieczyslaw_blaszczyk@sggw.pl

1. Wprowadzenie. 2. Co to są psychrofile? 3. Prokarioty psychrofilne. 4. Środowiska psychrofilne. 5. Podsumowanie

Where can you encounter psychrophiles?

Abstract: The Author, besides the history of research, characterizes cold environments, where obligatory psychrophiles are encountered. Obligatory psychrophiles are not able to grow at room temperature. The list of obligatory psychrophiles is still quite short and includes a little more than 50 species of prokaryotes. The members of psychrophiles mainly belong to *γ-Proteobacteria* class (genera: *Colwellia, Moritella*, *Photobacterium*, *Psychromonas*, *Shewanella*) and *Deinococcus*, *Firmicutes* and *Actinobacteria* phylla. Up till now, obligatory psychrophilic prokaryotes are endemic and are encountered in exactly and definied cold environments.

1. Introduction. 2. Definitions and groups of psychrophiles. 3. Psychrophilic prokaryotes. 4. Cold environments. 5. Summary

Słowa kluczowe: psychrofile, środowiska psychrofilne, lodowce, lody morskie, tundra, wieczna zmarzlina, Arktyka, Antarktyda
Key words: psychrophiles, cold environments, glaciers, sea ice, tundra, permafrost, Arctica, Antarctica

1. Wprowadzenie

Ziemia jest planetą zimna. Około 85% całej biosfery ma temperaturę poniżej 5°C. Zimne środowiska to Arktyka, Antarktyda, góry wiecznie ośnieżone, głębiny oceanów. Wody oceaniczne zajmują 75% powierzchni globu ziemskiego, przy czym 90% wód oceanicznych ma temperaturę poniżej 5°C. Pozostałe zimne środowiska to: wieczna zmarzlina (24% powierzchni lądów), lody morskie (13% powierzchni Ziemi) oraz lodowce (10% powierzchni lądów) a także zimne gleby, zimne pustynie, jeziora i jaskinie [2]. Woda w glebach zamarza poniżej 0°C, zaś woda morska zamarza w temperaturze około –1,9°C. Kontynent Antarktydy jest miejscem występowania wielu wyspecjalizowanych biotopów. Są to:

(1) biotopy morskie (lód, osady, toń wodna, morskie solanki lodowe, morskie zwierzęta bezkręgowe i kręgowe),
(2) biotopy wodne na lądzie (stawy, okresowo pokryte lodem jeziora, jeziora permanentnie skute lodem, jeziora polodowcowe, lód jeziorny, rzeki i strumienie),
(3) biotopy lądowe (śnieg, lodowce, gleby, wulkany, skały).

Każdy z tych biotopów jest determinowany przez jeden lub kilka czynników takich jak niska temperatura, szeroki zakres fluktuacji temperatury, susza, silne zasolenie, okresowo silne promieniowanie oraz niski poziom substancji pokarmowych. Wiele mikroorganizmów żyje w środowiskach zimnych: bakterie, archeony, glony, grzyby i pierwotniaki.

Po raz pierwszy w 1887 roku F o s t e r doniósł, że bakterie mogą rosnąć i rozmnażać się w temperaturze 0°C [30]. Kilkanaście lat później S c h m i d t - N i e l s e n (1902) wprowadził termin bakterie psychrofilne, do opisania tego typu zdolności. Do izolacji prawdziwych bakterii psychrofilnych doszło dopiero w latach 1960-tych, które jak się okazało zostały podzielone na dwie kategorie: stenotermiczne i eurytermiczne. M o r i t a [30] wprowadza nową definicję i klasyfikację bakterii rosnących w niskich temperaturach. Przez długi czas były one traktowane jako organizmy egzotyczne, ale w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie nimi z powodów biotechnologicznych. Jak się okazuje, bakterie psychrofilne są silnie filogenetycznie zróżnicowane, należą do różnych taksonów, są także reprezentantami ważnych grup fizjologicznych takich jak metanotrofów, redukujących siarczany i metanogenów.

2. Co to są psychrofile?

Termin psychrofile w ogólności opisuje organizmy, które rosną w środowiskach zimnych. Psychrofile rozmnażają się w temp. 0–10°C, metabolizują w śniegu i lodzie w temp. –20°C, przypuszcza się, że są aktywne przy –40°C a mogą żyć w temp. –45°C.

Środowiska zimne zasiedlone są przez trzy grupy mikroorganizmów [22, 30]:

(1) psychrofile (psychrofile obligatoryjne), które są zdolne do wzrostu w temp. poniżej 20°C, przy czym temperatura optymalna dla ich wzrostu jest jeszcze niższa (<15°C). Rosną również w temperaturze poniżej zera, ale nie rosną w temperaturze pokojowej (>20°C) [30],
(2) umiarkowane psychrofile, które są zdolne do wzrostu z minimalną temp. ≤0°C oraz temp. maksymalną ≤25°C [22],

(3) psychrotolerancyjne, które mogą rosnąć w temperaturze wody bliskiej zero, chociaż ich temperatura optymalna waha się zakresie od 20 do 40°C. Są one uważane jako mezofile tolerujące niskie temperatury.

Dla pierwszej, drugiej oraz trzeciej kategorii organizmów stosuje się również następujące terminy: stenopsychrofile (do pierwszej grupy) oraz eurypsychrofile (do drugiej i trzeciej grupy) [30]. Terminy te wedle prawa tolerancji S h e l f o r d' a opisują odpowiednio wąski i szeroki zakres tolerancji na termiczny determinant środowiskowy. Stenopsychrofile to mikroorganizmy, które rosną w wąskim przedziale temperaturowym i nie tolerują wyższych temperatur, sprzyjających rozwojowi mezofili. Eurypsychrofile to takie mikroorganizmy, które występują w środowiskach zimnych, ale rosną najchętniej w temperaturach sprzyjających rozwojowi mezofili. W całej przyrodzie istnieje znacznie więcej psychrotolerantów niż prawdziwych psychrofili. Z badań wynika, że nawet środowiska arktyczne, a także gleby i wody, zawierają więcej psychrotolerantów niż prawdziwych psychrofili. W strefie umiarkowanej i tropikalnej występują tylko psychrotoleranty [11], zaś psychrofile nie występują, ponieważ nie są w stanie współzawodniczyć z mikroorganizmami, które lepiej rosną w temperaturach wyższych. Istnieje jednak wiele środowisk, które są permanentnie zimne, faworyzują one wzrost i rozwój psychrofili obligatoryjnych.

3. Prokarioty psychrofilne

Psychrofile izoluje się ze środowisk, które są permanentnie zimne. Szczególnym źródłem mikroorganizmów psychrofilnych są morskie środowiska arktyczne i antarktyczne (wody morskie i osady o temp. ~ –1°C oraz lód morski, w którego kanalikach występuje solanka w okresie zimy w temp. do –35°C) oraz lodowce i pokrywa lodowa jezior do –5°C). Wody Arktyki i Antarktydy różnią się zasoleniem, zawartością tlenu, głębokością i grubością pokrywy lodowej. Z próby pobranej z Jeziora Ace, w którym nie ma tlenu, natomiast duże ilości metanu, izolowano pierwsze psychrofilne gatunki archeonów metanogennych: *Methanococcoides burtonii* i *Methanogenium frigidum* [16, 17]. *M. frigidum* jest psychrofilem, który nie rośnie w temp. >18°C. Jest fakultatywnym chemolitotrofem, który w warunkach autotroficznych wykorzystuje wodór jako źródło energii, w heterotroficznych mrówczan, a także pepton i ekstrakt drożdżowy (μ_{max} 0,24×doba^{-1}, T_d ~2,9 dni). *M. burtonii* jak się okazuje jest psychrotolerantem, który żyje w strefie beztlenowej wód Jeziora Ace i rośnie w zakresie temperatur od 1,7 do 29,5°C, z optimum 23,4°C ($\mu_{max} \sim 0{,}3 \times$ doba^{-1}). *Psychromonas ingrahamii* został wyizolowany w 1991 roku z próby pobranej z Elson Lagoon na Alasce z interfazy lód-woda [10]. Jest zdolny do wzrostu w temp. poniżej –12°C z czasem generacji 240 godz., natomiast temperatura optymalna dla tego psychrofila wynosi 5°C (czas generacji 12 godz.) Psychrofile są liczebnie i funkcjonalnie dominantami w permanentnie zimnych środowiskach, adekwatnie do ilości substancji odżywczych. W środowiskach niepermanentnie zimnych psychrofile mogą być dominantami, ale pod warunkiem, jeśli dostateczna ilość materii organicznej pozwala im na szybką reprodukcję w krótkim okresie. W głębinach oligotroficznych psychrofile i piezofile są liczebnie w mniejszości, ale funkcjonalnie oczywiście w większości [22]. Odgrywają one istotną rolę nie tylko w środowiskach permanentnie zimnych, ale i niepermanentnie zimnych.

Do tej pory wyizolowano niewiele ponad 100 nowych gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, rezydujących w ekosystemach permanentnie zimnych, uważanych za psychrofile *sensu lato* [5]. Należą one do następujących taksonów: *Alcaligenes*, *Alteromonas, Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Colwellia, Cellulophaga*, *Cytophaga*, *Gelidibacter*, *Glaciecola*, *Marinomonas*, *Methanococcoides*, *Methanogenium*, *Methanosarcina*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moritella, Octandecabacter*, *Phormidium*, *Photobacterium*, *Polaribacter*, *Polaromonas, Psychroserpens*, *Roseobacter*, *Shewanella*, *Sulfitobacter*, *Staleya* i *Vibrio.* Analiza filogenetyczna sekwencji 16S rRNA wskazuje, że psychrofilne *Bacteria* i *Archaea* należą do następujących pięciu głównych linii hodowlanych: *Actinobacteria, Bacteroidetes* i *Proteobacteria* oraz *Crenarchaeota* i *Euryarcheota*. Ignoruje się fakty, że grzyby i drożdże oraz niektóre gatunki glonów rosną w temperaturach poniżej 0°C.

Wśród prokariotów do obligatoryjnych psychrofili należą mikroorganizmy wymienione w tabeli I.

4. Środowiska psychrofilne

Psychrofile występują w permanentnie zimnych środowiskach tego rodzaju jak wody słodkie i morskie, lodowce i lód morski, śniegi, polarne i wysokogórskie gleby, zimne pustynie oraz wieczne zmarzliny.

Ż y c i e b a k t e r i i w l o d a c h. Lód jest szczególnym środowiskiem życia mikroorganizmów psychrofilnych. Mikroorganizmy występują zarówno w lodzie wiecznej zmarzliny, w lodowcach, w lodzie morskim i jeziornym oraz śniegu. Mogą tam żyć dzięki temu, że między kryształkami lodu istnieją przestrzenie z wodą. Woda w tych przestrzeniach jest w stanie płynnym, jeśli temperatura lodowca nie przekracza –5°C (lodowce), lub jak w lodzie morskim –35°C. Wy-

Tabela I

Lista obligatoryjnych psychrofili z Domeny *Archaea* i *Bacteria*, izolowanych ze środowisk zimnych [5–10, 17, 19, 20, 24, 26–29, 32–36, 38, 39, 41, 44–47]

Typy/klasy	Rodzaj/rodzaje	Gatunek/gatunki
Domena *Archaea*		
typ *Euryarchaeota*	*Methanogenium*	*M. frigidum*
typ *Crenarchaeota*	*Cenarchaeum*	*C. symbiosum*
Domena *Bacteria*		
typ *Actinobacteria*	*Micrococcus*	*M. antarcticus*
	Cryobacterium	*C. psychrophilum*
typ *Bacteroidetes*	*Flavobacterium*	*F. omnivorum, F. segetis, F. weaverense, F. xjiangense*
	Polaribacter	*P. franzmanii, P. filamentus, P. ingensii*
	Psychrofluxus	*P. torquis*
	Psychroserpens	*P. burtonensis*
typ *Firmicutes*	*Clostridium*	*C. algoriphilum, C. bowmanii, C. estertheticum, C. frigoris, C. lacusfryxellense, C. psychrophilum*
typ *Proteobacteria*		
α-*Proteobacteria*	*Octadecabacter*	*O. arcticus, O. antarcticus*
β-*Proteobacteria*	*Polaromonas*	*P. vacuolata*
γ-*Proteobacteria*	*Colwellia*	*C. demingiae, C. piezophila, C. psychrerythrea, C. rossensis*
	Glaciecola	*G. pallidula, G. psychrophila*
	Methylobacter	*M. psychrophilus*
	Moritella	*M. abyssi, M. dasanensis, M. japonica, M. marina, M. profunda, M. yayanosii*
	Photobacterium	*P. frigidiphilum, P. profundum*
	Psychrobacter	*P. frozii, P. glacincola, P. maritimus*
	Psychromonas	*P. hadalis, P. ingrahamii, P. kaikoae*
	Shewanella	*S. benthica, S. livingstonensis, violacea*
δ-*Proteobacteria*	*Desulfofaba*	*D. gelida*
	Desulfofrigus	*D. oceanense*
	Desulfotalea	*D. psychrophila*

stępowanie w kanalikach lodu wody w stanie płynnym jest ściśle uzależnione od zasolenia. I tak, zasolenie 100, 145 i 216 g NaCl/l pozwala na utrzymanie wody w stanie płynnym odpowiednio w temp. –6, –10 i –21°C [31]. Najzimniejsze dotąd zbadane formy lodu zawierały bakterie żyjące w fazie ciekłej, w kanalikach i kieszonkach z wodą zasoloną, powstałych po zamarznięciu lodu morskiego. Całkowita liczba bakterii w kanalikach lodu morskiego waha się od $5{,}4\times10^4$ do $2{,}4\times10^6$ komórek/ml (żywotność od 2–27%) i jest o dwa rzędy wyższa w porównaniu do ich liczby w wodzie morskiej – do $5{,}1\times10^4$ komórek/ml i jest ich więcej, gdy w kanalikach znajdują się także glony. Bakterie heterotroficzne są głównymi organizmami występującymi w lodzie morskim, odpowiednio zaadaptowanymi do środowisk zimnych i zasolonych. Za produkcję materii organicznej w kanalikach lodu, najintensywniej w świeżo powstałych kryształach lodu, odpowiedzialne są *Cyanobacteria* oraz niektóre glony. Z bakterii heterotroficznych dominują należące do klasy α-*Proteobacteria* (*Octadecabacter*); γ-*Proteobacteria* [*Alteromonas*, *Colwellia* (*C. psychrotropica*), *Glaciecola, Pseudoalteromonas*, *Shewanella* (*S. frigidimara*)], typu *Bacteroidetes* (*Cytophaga, Flavobacterium, Gelidibacter i Polaribacter*) oraz typu *Actinobacteria.* Badania z zastosowaniem ^{3}H-tymidyny i leucyny prowadzone w lodach Antarktydy wskazują na aktywność metaboliczną bakterii w temp. –17°C a w lodach tundry z zastosowaniem octanu do –20°C [25]. Z badań składu chemicznego wody w kanalikach lodów morskich Weddell Sea wynika, że zawiera ona znaczne ilości substancji odżywczych a stężenie DOC (*Dissolved Organic Carbon*) jest zacznie wyższe niż stężenie DOC w wodzie morskiej i dochodzi do wartości ~1 mM C-org. [21]. Węglowodany stanowią około 31% całej puli DOC, co wskazuje na występowanie dużej biomasy glonów w korze i płytkach lodu. W innych środowiskach lodowych zawartość węglowodanów waha się od 10 do 29% całej puli węgla organicznego, przy czym znaczną część stanowią monosacharydy [21].

W i e c z n a z m a r z l i n a (p e r m a f r o s t). Wieczna zmarzlina obejmuje 26% powierzchni gleb i sięga od 0,5 do ponad 1450 m w głąb od powierzchni Ziemi. Wieczna zmarzlina to grunty, których temperatura przez cały czas jest poniżej 0°C. Sezonowo temperatura na powierzchni permafrost w okresie lata jest powyżej zera a rozmarznięta warstwa zwana jest warstwą aktywną, o grubości od kilku decymetrów w górnej części Arktyki do 2 m. Wieczna zmarzlina jest szczególnym termicznym fenomenem i nie zależy od składu gruntu. Temperatura wiecznej zmarzliny w Arktyce waha się

od zera do –17°C, podczas gdy na Antarktydzie temperatura waha się od –18 do –27°C. Zmarzlina arktyczna zawiera od 0,35 do 10% węgla organicznego, pH neutralne oraz potencjał redoks od + 40 do –256 mV i zasolenie 5–7%, zaś antarktyczna zmarzlina jest uboga w węgiel organiczny, jest lekko alkaliczna i charakteryzuje się wysokimi wartościami redoks. W próbach (3-metrowe profile) pobranych z wysokogórskich (3833 m) wiecznych zmarzlin Gór Tianshan (Chiny) występuje 2,5–6,0 × 10^5 jtk/g s.m. inkubowanych w temp. 4°C [1]. Wśród 91 tlenowych izolatów dominują bakterie należące do czterech typów: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* oraz *Bacteriodetes*. W znakomitej większości bakterie należą do rodzaju *Arthrobacter.* Wśród izolatów tylko dwa gatunki *Psychrobacter fozii* i *Psychrobacter maritimus* są psychrofilami, pozostałe 89 izolatów to umiarkowane psychrotrofy i psychrotolerancyjne [1]. Cztery gatunki psychrofilne *Deinococcus* izolowane z wiecznej zmarzliny z profilu glebowego gór znacznie powyżej strefy lasów oporne są na promieniowanie gamma (10% redukcja przy ≤4 KGy (Kilogrej): *D. radiomollis*, *D. claudionis*, *D. altitudinis*, *D. alpinitundrae*. W wiecznej zmarzlinie występują różne struktury termiczne, np. niezamarznięte miejsca w kształcie placków (unfrozen taliks), kriopegi (solankowe lub solne obszary o wymiarach 0,5×3–5 m, zawierające 140–300 g/l soli), powstałe w czasie regresji oceanu polarnego 120 tys. lat temu. W solankach kriopegów całkowita liczba bakterii wynosi 10^7 jtk/ml i jest zbliżona do ilości bakterii w wodzie oraz zimnych osadach [18]. Z hodowalnych najliczniej reprezentowane są gatunki bakterii beztlenowych. Najczęściej izolowanymi to gatunki należące do *Psychrobacter* (tylko *Psychrobacter glacincola* jest bezwzględnym psychrofilem) [3, 4] oraz gatunki należące do *Clostridium* (Tab. II).

P s y c h r o f i l e w o t w a r t y c h p r z e s t r z e n i a c h i g ł ę b i n a c h o c e a n ó w. Pomimo że wody oceaniczne stanowią 75% powierzchni globu ziemskiego, badania nad mikroorganizmami są w początkowym stadium. Głębiny oceanów poniżej 1000 m pokrywają 60% powierzchni Ziemi i należą do środowisk skrajnych, ponieważ panuje tam ciśnienie dochodzące do 110 MPa (=1100 atm.), woda osiąga temp. 2–4°C (okazjonalnie – przy kominach hydrotermalnych 400°C) i jest słona, panują tam ciemność, łatwo dostępne substancje pokarmowe występują w ekstremalnie niskich stężeniach, przy dostatecznie wysokim stężeniu tlenu w całym (11-km) słupie wody. W głębinach oceanów występują trzy kategorie bakterii psychrofilnych: obligatoryjne i umiarkowane oraz psychrotolerancyjne [43]. Na liście bakterii morskich, zawierającej niewiele ponad 600 izolatów, nieliczne gatunki to obligatoryjne psychrofile w rozumieniu M o r i t y. Po 10 latach badań, głównie Japończyków, którzy prowadzili analizy mikrobiologiczne osadów Rowu Japońskiego i Rowu Mariańskiego w ramach programu JAMSTEC (The Japan Agency for Marine-Earth Science & Technology) można nieco więcej powiedzieć o bakteriach głębin morskich i oceanicznych. W głębinach i osadach oceanów występują psychrofile (część z nich to także piezofile = barofile [26]), zebrane w pięciu rodzajach, należących wyłącznie do γ-*Proteobacteria*: *Colwellia*, *Moritella, Photobacterium*, *Psychromonas* i *Shewanella* (patrz lista psychrofili). W Oceanie Arktycznym znaleziono następne dwa

T a b e l a I I

Charakterystyka bakterii izolowanych z wiecznej zmarzliny [1, 12, 37, 40]

Gatunek bakterii	Temperatura wzrostu		Czas generacji (dni)*
	min.	opt.	
Psychrobacter cryopegella	–10	22	62,5
Carnabacterium pleistocenium	0	24	–
Clostridium algoriphilum	–5	5	2,1
Psychrobacter arcticus	–2,5	26	3,5
Psychrobacter sp. 215–51	–2,5	26	3,5
Psychrobacter fozii	–	12	–
Psychrobacter maritimus	–	12	–
Exiguobacterium sibiricum	–2,5	42	5,5
Virgibacillus sp.	0	30	2,4
Sulfobacillus sp.	–4	25	3,5
D. altitudinis	5	10	–
D. alpinitundrae	5	10	–
D. claudionis	5	10	–
D. radiomollis	5	10	–

* czas generacji przy minimalnej temperaturze wzrostu

Tabela III

Liczebności bakterii psychrofilnych i psychrotolerancyjnych w próbach pobranych z Morza Weddell w południowej części Oceanu Atlantyckiego (okolice Antarktydy) [22]

Próby z Morza Weddell	Temperatura inkubacji		Stosunek jtk 1/22°C	Stosunek aktywności 1/22°C
	1°C (jtk /ml)	22°C (jtk /ml)		
Lód morski	405200	200	2500	3,1
Powierzchnia wody	37 (10–60)	200 (10–510)	0,58 (0,12–1,0)	3,4 (1,8–6,5)
Woda, głęb. 1000 m	45 (30–60)	130 (80–180)	0,45 (0,16–0,75)	0,21 (0,25–0,4)
Woda, głęb. 2000 m	10 (0–20)	65 (10–120)	0,18 (0,16–0,20)	0,15 (0,11–0,20)

Tabela IV

Liczebności bakterii psychrofilnych i psychrotolerancyjnych w próbach Oceanu Arktycznego (ARKXIII/2) [22]

Próby pobrane z Oceanu Arktycznego	Temperatura		Stosunek jtk 1/22°C	Iloraz aktywności 1/22°C
	22°C (jtk/ml)	1°C (jtk/ml)		
Lód morski	46180 (4500–62900)	2031 (10–9090)	107 (4–370)	2,1 (1,2–3,1)
Roztopy	4700 (200–10800)	27 (0–140)	670 (20–3020)	2,0 (1,2–3,0)
Powierzchnia wody	4800 (300–26200)	450 (10–3382)	49 (3–137)	1,3 (1,2–1,4)

gatunki psychrofilne *Moritella dasanensis* i *Glaciecola psychrophila* oraz trzy psychrofilne gatunki bakterii redukujących siarczany: *Desulfotalea psychrophila, Desulfofrigus oceanense* i *Desulfofaba gelida* (δ-*Proteobacteria*).

Wyniki badań Hwelmke i Weyland [22] wskazują, że psychrofile stanowią tylko część zespołu mikroorganizmów zasiedlających toń i głębiny oceanów (Tab. III i Tab. IV).

Rola ekologiczna bakterii psychrofilnych. Zdolność eurypsychrofili do wzrostu w wyższych temperaturach jest ekologicznie istotna. Np. mikroorganizmy wiecznych zmarzlin są narażane na cykle zamrażania i rozmrażania w zakresie od –45°C do 25°C. Takie zmiany temperatury mają miejsce w tundrze. W czasie zimy w pokładach zmarzliny gromadzą się duże ilości metanu, który w okresie letnim, po rozmrożeniu podłoża ulatnia się do atmosfery. Także w zimnych głębokich wodach morskich np. podmorskich górach w Baby Bare (1,8°C) położonej w Juan de Fuca Ridge, bakterie i archeony mogą cyrkulować w cieplejszej części (19°C) przez część swego cyklu życiowego. Jest to dobry przykład sił, które prowadzą selekcję eurypsychrofilnych mikroorganizmów, rosną efektywnie w niskich temperaturach oraz tolerują wyższe temperatury. Przykładem bakterii, która jest dominantem należącym do eurypsychrofili jest *Sphingopyxis alaskensis*, występujący w wodach Płn. Pacyfiku w pobliżu Alaski i Japonii [42]. W otwartej przestrzeni oceanu występuje on w ilości 10^5 komórek/ml, mimo że najlepiej rośnie w temp. 37°C, a rośnie nawet w 45°C. Jego zdolność do współzawodnictwa w naturalnych środowiskach wykazuje możliwości adaptacji do niskich temperatur niezależnie od tego, że temperatury optymalna i maksymalna mieszczą się w zakresie mezofilności.

5. Podsumowanie

Ogłoszona w październiku 1998 roku lista bakterii morskich zawiera ponad 650 izolatów hodowalnych w randze gatunku oraz szczepów należących do określonego rodzaju (microbe.cbl.umces.edu/MO2006/marbac.html). Najliczniej reprezentowane są gatunki należące do γ-*Proteobacteria*, wśród nich jest zaledwie kilkanaście bezwzględnych psychrofili. Oczekiwana następna lista bakterii morskich będzie zapewne rozszerzona o następne odkryte hodowalne gatunki bakterii. W ostatnich latach opisano następną grupę bezwzględnych psychrofili, ale ich lista nie jest tak imponująca jak by oczekiwano. Jest zaskakujące, jak niewiele gatunków bakterii i archeonów na tle ogólnej liczby prokariotów hodowalnych jest prawdziwymi psychrofilami, pomimo że nasza planeta jest zimna.

Bakterie psychrofilne są ważne z biotechnologicznego punktu widzenia. Kwasy tłuszczowe omega-3 są istotnymi składnikami odżywczymi wyższych organizmów, od zooplanktonu do ludzi (PUFA). Wiele organizmów, włącznie z ludźmi nie jest zdolna do syntezy tych związków *de novo* i wymaga ich w diecie. Omega-3 są kwasami nienasyconymi, zawierającymi 18, 20 lub 22 atomów węgla w cząsteczce, mającymi podwójne wiązanie C=C przy trzecim węglu od końca (omega). Powszechnymi kwasami omega-3 są kwasy: ejkozapentenowy (EPA – $C_{19}H_{29}COOH$) oraz dokozaheksenowy (DHA – $C_{21}H_{31}COOH$) produkowane przez psychrofile, zalecane przez lekarzy jako uzupełnienie w diecie przeciwmiażdżycowej. Nie jest jasne, dlaczego pewne bakterie psychrofilne oraz piezofilne produkują kwasy omega-3, np. psychrofilne gatunki *Shewanella* a inne ich nie produkują np. *Photobacterium profundum* [34].

Piśmiennictwo

1. Bai Y., Yang D., Wang J., Xu S., Wang X., An L.: Phylogenetic diversity of culturable bacteria from alpine permafrost in the Tianshan Mountains, northwestern China. *Res. Microbiol*. **157**, 741–751 (2006)
2. Bakermans C.: Genetic approaches to determining psychrotolerance mechanisms. Oral presentation, 108th General Meeting, ASM, Toronto, Canada, 2007
3. Bakermans C., Ayala-del-Río H.L., Ponder M.A., Vishnivetskaya T., Gilichinsky D., Thomashow F., Tiedje J.M.: *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **56**, 1285–1291 (2006)
4. Bakermans C., Nealson K.H.: 2004. Relationship of critical temperature to macromolecular synthesis and growth yield in *Psychrobacter cryopegella*. *J. Bacteriol.* **186**, 2340–2345 (2004)
5. Bowman J.P., McCammon S.A., Brown M.V., Nicholas D.S., McMeekin T.A.: Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic Sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3068–3078 (1997)
6. Bowman J.P., Gosink J.J., McCammon S.A., Lewis T.E., Nichols D.S., Nichols P.D., Skerratt J.H., Staley J.T., McMeekin T.A.: *Colwellia demingiae* sp. nov., *Colwellia hornerae* sp. nov., *Colwellia rossensis* sp. nov. and *Colwelia psychrotropica* sp. nov.: psychrophilic Antarctic species with the ability to synthetize docosahexaenoic acid (22:6ω3). *Int. J. Syst. Bacteriol*. **48**, 1171–1180 (1998)
7. Bowman J.P., McCammon S.A., Lewis T., Skerratt J.H., Brown J.L., Nichols D.S., McMeekin T.A.: *Psychroflexus torquis* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic species from Antarctic sea ice, and reclassification of *Flavobacterium gondwanense* (Dobson et al. 1993) as *Psychroflexus gondwanense* gen. nov., comb. nov. *Microbiol*. **144**, 1601–1609 (1998)
8. Bowman J.P., McCammon S.A., Brown J.L., Nichols P.D., McMeekin T.A.: *Psychroserpens burtonensis* gen. nov., sp. nov., and *Gelidibacter algens* gen. nov., sp. nov., psychrophilic bacteria isolated from Antarctic lacustrine and sea ice habitats. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **47**, 670–677 (1997)
9. Bozal N., Montes M.J., Tudela E., Jimenez F., Guinea J.: *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Int. J. System Evol. Microbiol*. **52**, 195–205 (2002)
10. Breezee J., Cady N., Staley J.T.: Subfreezing growth of the sea ice bacterium *Psychromonas ingrahamii*. *Microb. Ecol.* **47**, 300–304 (2004)
11. Brock T.D., Fred Passman F., Yoder I.: Absence of obligately psychrophilic bacteria in constantly cold springs associated with aves in Southern Indiana *Amer. Midland Naturalist*, **90**, 240–246 (1973)
12. Callegan R.P., Nobre M.F., Mc Ternan P.M., Battista J.R., Navarro-Gonzalez R., McKay C.P., da Costa M.S., Rainey F.A.: Description of four novel psychrophilic, ionizing radiation-sensitive *Deinococcus* species from alpine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **58**, 1252–1258 (2008)
13. Cavicchioli R.: Cold-adapted *Archaea*. *Nature Rev. Microbiol.* **4**, 331–343 (2006)
14. Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., Sowers K.R.: Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opinion Biotechnol.* **13**, 253–261 (2002)
15. Clocksin K.M., Jung D.O., Madigan M.T.: Cold-active chemoorganotrophic bacteria from permanently ice-covered Lake Hoare, McMurdo Fry Valleys, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 3077–3083 (2007)
16. D'Amico S., Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C.: Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports*, **7**, 385–389 (2006)
17. Franzmann P.D., Liu Y., Balkwill D.L., Aldrich H.C., de Macario E.C., Boone D.M.: *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H_2-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 1068–1072 (1997)
18. Gilochinsky D., Rivkina E., Bakermans C., Shcherbakova V., Petrovskaya L., Ozeskaya S., Ivanushkina N., Kochkina G., Laurinavichuis K., Pecheritsina S., Fattakhova R., Tiedje J.M.: Biodivesity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**, 117–128 (2005)
19. Gosink J.J., Woese C.R., Staley J.T.: *Polaribacter* gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov. gas vacuolate polar marine bacteria of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group and reclassification of "*Flectobacillus glomeratus*" as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 223–235 (1998)
20. Gosink J.J., Herwig R.Pl., Staley J.T.: *Octadecobacter arcticus*, gen. nov., sp. nov. and *O. antarcticus*, sp. nov., nonpigmented, psychrophilic gas vacuolate bacteria from polar sea ice and water. *Syst. Appl. Microbiol*. **20**, 356–365 (1997)
21. Herborg L.M., Thomas D.N., Kennedy H., Haas C., Dieckmann G.S.: Dissolved carbohydrates in Antarctic sea-ice. *Antarctic Science*, **13**, 119–125 (2001)
22. Hwelmke E., Weyland H.: Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria – occurence and significance in polar and temperate marine habitats. *Cell. Molecular Biol.* **50**, 553–561 (2004)
23. Irgens R.L., Gosink J.J., Staley J.T.: *Polaromonas vacuolata* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, marine, gas vacuolate bacterium from Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **46**, 822–826 (1996)
24. Junge K., Imhoff F., Staley T., Deming J.W.: Phylogenetic diversity of numerically important arctic sea-ice bacteria cultured at subzero temperature. *Microb. Ecol.* **43**, 315–328 (2002)
25. Junge K., Eicken H., Deming J.W.: Motility of *Colwellia psychrerythrea* strain 34H at subzero temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4282–4284 (2003)

26. Kato C., Qureshi M.H.: Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 87–92 (1999)
27. Kim H.J., Park S., Lee J.M., Park S., Jung W., Kang J.K., Joo H.M., Seo K.W., Kang S.H.: *Moritella dasanensis* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Arctic ocean. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **58**, 817–820 (2008)
28. Knoblauch C., Sahm K., Jörgensen B.B.: Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **49**, 1631–1643 (1999)
29. Liu H., Xu Y., Ma Y., Zhou P.: Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **50**, 715–719 (2000)
30. Morita R.Y.: Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev*. **39**, 144–167 (1975)
31. Mock T., Thomas D.N.: Recent advances in sea-ice microbiology. *Environ. Microbiol.* **7,** 605–619 (2005)
32. Nogi Y., Hosoya S., Kato C. Horikoshi K.: *Psychromonas hadalis* sp. nov., a novel piezophilic bacterium isolated from the bottom of the Japan Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **57**, 1360–1364 (2007)
33. Nogi Y., Hosoya S., Kato C., Horikoshi K.: *Colwellia piezophila* sp. nov., a novel piezophilic species from deep-sea sediments of the Japan Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1627–1631 (2004)
34. Nogi Y., Kato C., Horikoshi K.: *Moritella japonica* sp. nov., a novel barophilic bacterium isolated from a Japan Trench sediment. *J. Gen. Appl. Microbiol*. **44**, 289–295 (1998a)
35. Nogi Y., Masui N., Kato C.: *Photobacterium profundum* sp. nov., a new, moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment. *Extremophiles*, **2**, 1–8 (1998)
36. Nogi Y., Sato C., Horikoshi K.: Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Arch. Microbiol*. **170**, 331–338 (1998)
37. Ponder M.A., Thomashow M.F., Tiedje J.M.: Metabolic activity of Siberian permafrost isolates, *Psychrobacter arcticus* and *Exiguobacterium sibiricum*, at low water activities. *Extremophiles*, DOI 10.1007/s00792-008-0151-0 (2008)
38. Seo H.J., Bae S.S., Lee J.H., Kim S.J.: *Photobacterium frigidiphilum* sp. nov., a psychrophilic, lipolytic bacterium isolated from deep-sea sediments of Edison Seamount. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **55**, 1661–1666 (2005)
39. Spring S., Merkhoffer B., Weiss N., Kroppenstedt R.M., Hippe H., Stackebrandt E.: Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **53**, 1019–1029 (2003)
40. Steven B., Leveille R., Pollard W.H., Whyte L.G.: Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles*, **10**, 259–267 (2006)
41. Suzuki K.I., Sasaki J., Uramoto M., Nakase T., Komagata K.: *Cryobacterium psychrophilum* gen. nov., sp. nov., nom. rev., comb. nov., an obligate psychroplic actinomycete to accomodate "*Curtobacterium psychrophilum*" inoue and Komagata 1876. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **47**, 474–478 (1997)
42. Vancanneyt M., Schu F., Snauwaert C., Goris J., Swings J. Cottschal J.C.: *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 73–79 (2001)
43. Vorobyova E., Soina V., Gorlenko M., Minkovskaya N., Zalinova N., Mamukelshvih A., Gilichinsky D., Rivkma E., Vishnivetskaya T.: The deep cold biosphere: facts and hypotesis. *FEMS Microbiol. Reviews*, **20**, 277–290 (1997)
44. Xu Y., Nogi Y., Kato C., Liang Z., Ruger H.J., de Kegel D., Glansdorff N.: *Moritella profunda* sp. nov. and *Moritella abyssi* sp. nov., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 533–538 (2003)
45. Yi H., Chun J.: *Flavobacterium weaverense* sp. nov. and *Flavobacterium segetis* sp. nov., novel psychrophiles isolated from the Antarctic. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **56**, 1239–1244 (2006)
46. Zhang D.C., Yu Y. Chen B., Wang H.X., Liu H.C., Dong X.Z., Pei-Jin Zhou P.J.: *Glaciecola psychrophila* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the Arctic. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2867–2869 (2006)
47. Zhu F., Wang S., Zhou P.: *Flavobacterium xinjiangense* sp. nov. and *Flavobacterium omnivorum* sp. nov., novel psychrophiles from the China No. 1 glacier. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **53**, 853–857 (2003)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 215–224
http://www.pm.microbiology.pl

WYSTĘPOWANIE I ROLA MYKSOBAKTERII W ŚRODOWISKU NATURALNYM

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Monika Anna Michałowska*, Stefan Russel

Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Wydział Rolnictwa i Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159, tel. (22) 593 26 36
* Autor korespondencyjny: e-mail: monika_michalowska@sggw.pl

1. Wprowadzenie. 2. Występowanie i ekologia. 3. Charakterystyka morfologiczna komórek. 4. Kolonie myksobakterii. 5. Społeczne zachowanie myksobakterii. 6. Fizjologia myksobakterii oraz wytwarzanie biologicznie czynnych metabolitów wtórnych. 7. Zastosowanie myksobakterii. 8. Podsumowanie

The occurrence and role of myxobacteria in the environment

Abstract: Myxobacteria are strictly aerobic, Gram negative slime bacteria with rod-shaped vegetative cells. They are cosmopolitan microorganisms which mostly occur in many types of soils. Myxobacteria also develop on the bark of trees, surface of leaves, decaying plant debris and dung of herbivorous animals such as rabbits, hares, sheeps, deers and goats.

They are unique among prokaryotes because of very fascinating and complicated life cycle. They use cell-to-cell communication to engage in cooperative morphogenesis from which they produce characteristic survival structures called fruiting bodies. The formation of fruiting bodies is induced by nutritional deficiency. These structures contain a large mass of myxospores which are resistant to unfavourable environmental conditions.

Furthermore myxobacteria possess other interesting features such as cooperative gliding motility and collective food uptake. Myxobacteria also display large enzymatic activity in biodegradation of many macromolecules. They use exoenzymes to decompose cellulose, starch, xylan, chitin or even lyze cells of other microorganisms, especially eubacteria and yeasts.

Myxobacteria produce a lot of bioactive secondary metabolites with antibiotic and even antitumor activity so they can be useful in various applications.

1. Introduction. 2. The occurrence and ecology. 3. Morphological characteristics of cells. 4. Myxobacterial colonies. 5. Social behaviour of myxobacteria. 6. Physiology of myxobacteria and biollogically active secondary metabolites. 7. Application of myxobacteria. 8. Summary

Słowa kluczowe: bakterie śluzowe, ciała owocujące, mikroflora glebowa, myksobakterie
Key words: slime bacteria, fruiting bodies, soil microflora, myxobacteria

1. Wprowadzenie

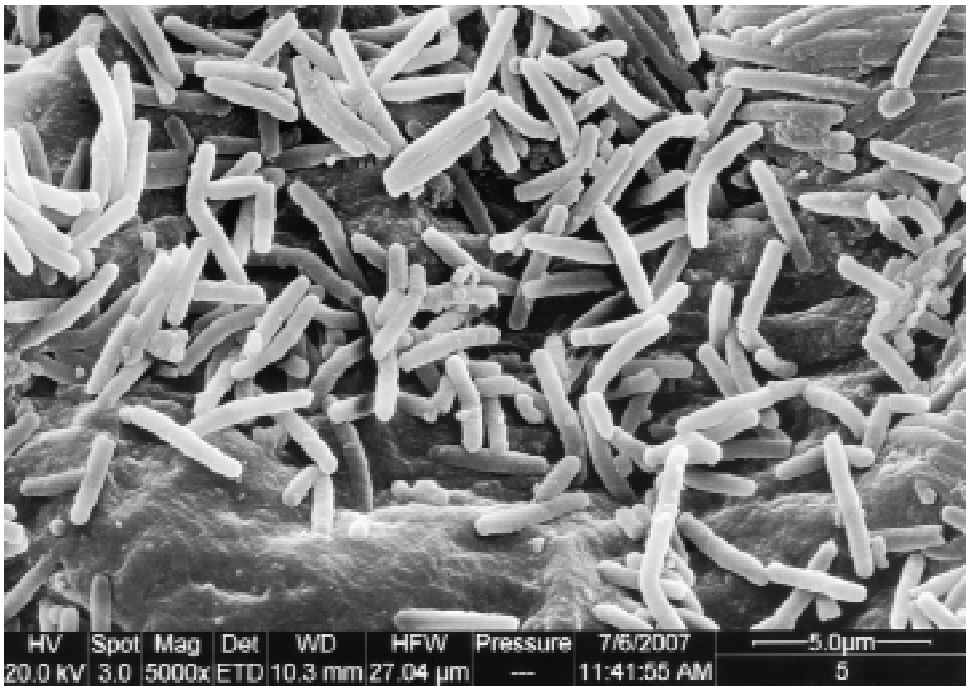
Od 20 lat myksobakterie stały się jednym z najbardziej fascynujących obiektów badań mikrobiologicznych. Według klasyfikacji B e r g e y' a myksobakterie należą obecnie do rzędu *Myxococcales*.

Myksobakterie są Gram-ujemnymi bakteriami o kształcie pałeczek, które powszechnie zasiedlają środowisko glebowe. Są to dosyć zagadkowe mikroorganizmy ze względu na niezwykły sposób życia. Wykazują charakterystyczny sposób poruszania się poprzez ruch ślizgowy po rozmaitych powierzchniach. Charakteryzuje je interesujący cykl życiowy, podczas którego, w warunkach wyczerpania substancji odżywczych formują specyficzne struktury przetrwalne, tzw. ciała owocujące, wewnątrz których gromadzone są komórki wegetatywne przekształcone w myksospory o niezwykle dużej odporności na niekorzystne warunki środowiska. Myksobakterie odznaczają się ogromnym potencjałem w syntetyzowaniu różnorodnych metabolitów wtórnych, spośród których wiele znajduje zastosowanie w medycynie i biotechnologii. Niektóre gatunki myksobakterii wykazują drapieżnictwo wobec innych organizmów, a także charakteryzują się dużą aktywnością hydrolityczną, szczególnie w rozkładzie komponentów drewna. Poza tym myksobakterie odznaczają się złożonym systemem interakcji międzykomórkowych będących zaczątkiem życia społecznego pomiędzy komórkami bakterii [6, 7, 9, 25].

W Polsce pionierami badań nad myksobakteriami byli H e l e n a i S e w e r y n K r z e m i e n i e w s c y. Badacze Ci na początku XX w. opublikowali kilka podstawowych prac dotyczących metodycznych aspektów badań myksobakterii oraz występowania ich w glebach Polski [16, 17, 18].

2. Występowanie i ekologia

Pierwotnym i naturalnym środowiskiem życia myksobakterii jest gleba, począwszy od wydm i piasków pustyń po żyzne czarnoziemy. Myksobakterie najliczniej zasiedlają powierzchniowe warstwy gleby, jednakże czynnikiem ograniczającym ich występowanie jest odczyn. Bakterie te preferują odczyn lekko kwaśny do lekko zasadowego, jednakże zdarzają się

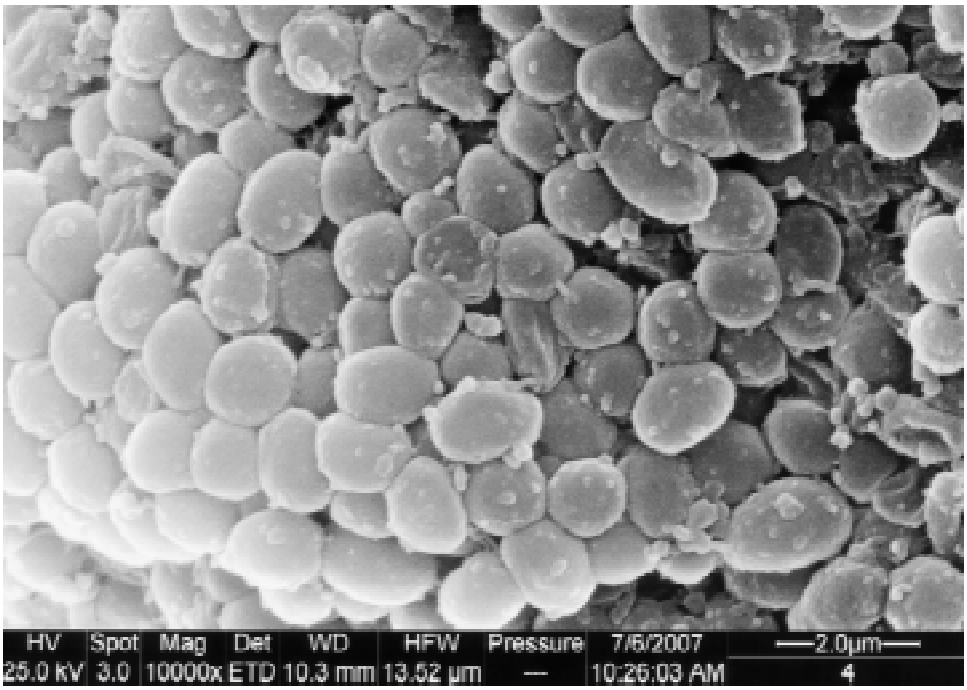


Fot. 1. Komórki wegetatywne *Sorangium cellulosum* o kształcie pałeczek (M.A. Michałowska)

Fot. 2. Młoda kolonia *Archangium gephyra* (M.A. Michałowska)

również myksobakterie zasiedlające środowiska o odczynie silnie zasadowym lub silnie kwaśnym. Obecność myksobakterii stwierdza się również w odchodach zwierząt roślinożernych (dzikich królików, zajęcy, jeleni, owiec, kóz, łosi), na rozkładających się szczątkach roślinnych oraz na korze i korzeniach drzew (w Europie najwięcej gatunków izolowano z dzikiego bzu, buku oraz grochodrzewu; są to przede wszystkim myksobakterie rozkładające celulozę z rodzaju *Sorangium*, ale również pewne gatunki niecelulolityczne). Okazjonalnie można zaobserwować ich występowanie na powierzchni liści [25, 29].

Nadal niewiele wiadomo na temat liczebności komórek myksobakterii w glebach. W 1 gramie różnych typów gleb liczba komórek myksobakterii waha się pomiędzy 2 000 i 80 000 a nawet 450 000. Tak zróżnico-



Fot. 3. Myksospory *Sorangium cellulosum* (M.A. Michałowska)

wane wyniki dotyczące liczebności myksobakterii świadczą o dużym wpływie czynników środowiskowych na ich występowanie. Liczebność myksobakterii jest ściśle uzależniona od szeregu właściwości fizycznych i chemicznych gleby, tj. od odczynu, zawartości węgla i azotu, struktury gleby, obecności mikroflory towarzyszącej, temperatury, wilgotności, natlenienia (napowietrzenia) gleby oraz wpływu gospodarki człowieka [6, 17].

Myksobakterie uważane są ogólnie za drobnoustroje mezofilne z optimum temperatury wynoszącym 30°C. Jednakże spotykane są nielicznie psychrofilne gatunki myksobakterii należące do rodzaju *Polyangium* i *Nannocystis* zdolne do wzrostu i rozwoju w zakresie temperatur 4–9°C, na przykład w glebach Antarktydy.

Myksobakterie mogą również zasiedlać środowisko wodne, m.in. ekosystemy słodkowodne takie jak rzeki, jeziora czy stawy, chociażby w wyniku nanoszenia ich wraz z cząstkami gleby za pośrednictwem wiatru.

Kolejnym, dosyć interesującym i zagadkowym środowiskiem bytowania myksobakterii są bagna. Obecność myksobakterii, m.in. przedstawicieli rodzaju *Angiococcus*, stwierdzono w alkalicznych bagnach o pH 6–8,7. Zadziwiające wydaje się również stwierdzenie obecności myksobakterii z rodzaju *Myxococcus*, *Corallococcus* oraz *Polyangium* w torfach o pH 3,2–4,8 [6].

Ogólnie można stwierdzić, że myksobakterie zasiedlają rozmaite środowiska, począwszy od Antarktydy po tropik i pustynie. W niekorzystnych warunkach przeżywają pod postacią myksospor odpornych na niskie temperatury, wysuszenie czy silne promieniowanie słoneczne. Najbogatszą mikroflorę myksobakteryjną obserwuje się w ciepłym, półsuchym klimacie, m.in. w południowo-zachodnich częściach USA, w północnych Indiach oraz Egipcie. Równie powszechnie występują w centralnej Europie, środkowo-zachodniej części USA i strefach o podobnych warunkach klimatycznych. W najbardziej ekstremalnych środowiskach, takich jak Sahara, północne lasy czy tereny położone na dużych wysokościach, stwierdza się niewielką ilość gatunków, przede wszystkim z rodzaju *Myxococcus*, *Corallococcus*, *Archangium* i *Nannocystis* [16, 17, 32].

3. Charakterystyka morfologiczna komórek

Komórki myksobakterii to średniej długości Gram-ujemne pałeczki. W zależności od gatunku posiadają 0,6–0,9 µm szerokości oraz 3–8 µm a niekiedy nawet 20 µm długości [12]. Komórki wegetatywne występują w dwóch różnych formach:

Typ I komórki: cienkie, zwykle elastyczne pałeczki do 1 µm szerokości oraz do 20 µm długości z mniej lub bardziej zwężonymi końcami (podrząd: *Cystobacterineae*).

Typ II komórki: cylindryczne, mniej elastyczne pałeczki z zaokrąglonymi końcami do 1 µm szerokości oraz do 10 µm długości (podrząd: *Sorangineae*).

Komórki myksobakterii posiadają ścianę komórkową zbudowaną z cienkiej warstwy peptydoglikanu (mureiny). Posiadają ponadto błonę zewnętrzną, która składa się z białek, fosfolipidów i lipopolisacharydów. Obok mannozy błona ta zawiera także galaktozę, glukozaminę i wiele innych cukrów. Ponadto stwierdza

się w niej obecność kwasu ketodeoksyoctanowego. W cytoplazmie komórek wegetatywnych gromadzone są materiały zapasowe, tj. substancje tłuszczowe oraz wolutyna [18, 25].

Ważnym składnikiem budującym ścianę komórkową oraz membrany komórek myksobakterii są lipopolisacharydy (LPS). Pod względem chemicznym, lipopolisacharydy występujące u myksobakterii, przypominają te, które odnajdujemy w komórkach enterobakterii.

Dość interesującym faktem wydaje się również wyizolowanie ceramidów i cerebrozydów z komórek *Cystobacter fuscus*. Są to specyficzne związki tłuszczowe (ceramidy zbudowane są przede wszystkim z nienasyconych kwasów tłuszczowych; cerebrozydy to substancje lipidowe złożone ze sfingozyny i glukozy lub – tak jak w przypadku myksobakterii – z glukozy). Związki te są bardzo powszechne u organizmów eukariotycznych i, co jest dosyć interesujące, odgrywają znaczącą rolę we wzajemnym rozpoznawaniu komórek a także ich adhezji. Występują także u grzybów podstawkowych z klasy *Basidiomycetes*, pełniąc rolę induktorów w powstawaniu owocników. Być może odgrywają podobną rolę u myksobakterii, co nadal pozostaje tajemnicą [31].

Przechodząc do charakterystyki pigmentów myksobakteryjnych należy podkreślić, iż są to przede wszystkim barwniki z grupy karotenoidów. Są one zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej. Ich synteza indukowana jest za pośrednictwem światła. Podstawową rolą karotenoidów jest ochrona komórek myksobakterii przed fotooksydacją. Dominującym barwnikiem myksobakterii jest tzw. myksobakton. Jednakże pewne pigmenty są charakterystyczne i wyłączne dla odpowiednich podgrup taksonomicznych.

Wiele uwagi w charakterystyce chemicznej natury komórek myksobakterii poświęca się białkom powierzchniowym, odgrywającym istotną rolę w interakcjach typu komórka-komórka oraz w morfogenezie. Dość często obserwuje się sytuacje, w których dochodzi do zmian ilościowych jak i zmian tempa syntezy błonowych i rozpuszczalnych białek, m.in. podczas formowania ciał owocujących, a w szczególności na etapie agregacji komórek wegetatywnych. Obserwuje się wówczas wzrost ilości i tempa syntezy rozpuszczalnych białek, których ilość może wzrosnąć z 1% (w komórkach wegetatywnych) nawet do 15% (podczas formowania ciał owocujących) [28].

Dość specyficznym białkiem jest myksobakteryjna hemaglutynina o nazwie lektyna, której synteza indukowana jest podczas agregacji komórek, m.in. u gatunku *M. xanthus*. Białko to gromadzone jest w przestrzeni peryplazmatycznej komórki lub występuje w formie luźno związanej na powierzchni komórki – w tej formie pełni ono funkcję białka receptorowego, zawierającego co najmniej dwa miejsca wiązania cukrów, w przypadku myksobakterii wiąże galaktozę, przyczyniając się w ten sposób do aglutynacji komórek podczas etapu agregacji.

Zaobserwowano również obecność białek wiążących nukleotydy. Stanowią one przedmiot zainteresowania ze strony wielu naukowców, chociażby z tego względu, że przypuszczalnie mogą one brać w transdukcji sygnału, np. podczas rozwoju komórkowego [31, 33].

Na powierzchni komórek niektórych myksobakterii, na przykład u gatunku *M. xanthus*, stwierdzono obecność specyficznych wyrostków, tj. pili i fimbrii, które mają ścisły związek z interakcją międzykomórkową. Pile ułożone są polarnie, z kolei fimbrie rozmieszczone są perytrychalnie, czyli dookoła komórki. Pełnią one istotną rolę w adhezji komórek oraz w społecznym „zachowaniu" myksobakterii [13, 34].

Komórki wegetatywne myksobakterii posiadają zdolność ruchu ślizgowego. Istnieje wiele hipotez dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za aktywność ruchową myksobakterii. W cytoplazmie komórek myksobakterii amerykański biolog Burchard wykrył obecność pasm mikrotubul i fibryli. Średnica mikrotubul waha się granicach od 10 do 16 nm (u gatunku *Ch. crocatus* nawet od 15 do 19 nm), z kolei średnica fibryli wynosi od 4 do 5 nm (u gatunku *Ch. crocatus* nawet od 7,5 do 10 nm). Fibryle są zazwyczaj zgrupowane w pakiety, które mogą posiadać 40 nm szerokości i 3,5 μm długości. Pakiety te zlokalizowane są zwykle w pobliżu błony cytoplazmatycznej i często przebiegają wzdłuż osi komórki, czasami mogą być również ułożone pionowo w postaci słupków a nawet układać się ukośnie. System kurczliwych fibryli jest uważany jako podstawowy mechanizm odpowiedzialny za ślizgowy ruch komórek wegetatywnych [28].

Lünsdorf i Reichenbach [25] wykryli z kolei inną strukturę odpowiedzialną za ruch myksobakterii, przypominającą łańcuch, zlokalizowaną poniżej zewnętrznej błony komórkowej. Ta struktura, składająca się z kurczliwych pierścieni, wprawia komórki w ruch, co widoczne jest na rozmaitych powierzchniach w postaci charakterystycznych wzorów czy fal. Wydzielanie śluzu, stanowiącego kompleks białkowo-polisacharydowo-tłuszczowy, dodatkowo wspomaga poruszanie się komórek i uwidocznione jest w formie wilgotnych, lśniących śladów pozostawianych przez myksobakterie [19].

4. Kolonie myksobakterii

Typowa kolonia myksobakterii jest układem złożonym z komórek i wydzielanego przez nie śluzu. Wydzielany zewnątrzkomórkowo śluz nadaje często kolonii charakterystyczny wygląd, przypominający

szlak splecionych śluzowych niteczek. Kolonia posiada zazwyczaj widoczne żyłki, pierścienie czy wzniesienia w postaci grzbietów, a nawet zagłębienia w powierzchni agaru. Takie wzory są zwykle bardzo specyficzne dla określonych rodzin, rodzajów a nawet gatunków, co może posłużyć jako jedna z użyteczniejszych cech umożliwiających identyfikację myksobakterii [25].

Kolonie mogą czasami ulegać rozpłynięciu na powierzchni podłoża pod wpływem wody wydzielanej na skutek rozkładu agaru przez niektóre myksobakterie, m.in. z rodzaju *Cystobacter* i *Stigmatella*. Czasami może również dochodzić do silnego przyklejania kolonii do powierzchni podłoża, niekiedy do takiego stopnia, że agar ulega rozerwaniu na kawałki, w szczególności w starzejących się koloniach (m.in. u przedstawicieli rodzaju *Sorangium*). W innych sytuacjach kolonie są tak delikatne i śluzowe w konsystencji, że bardzo łatwo można je zebrać z powierzchni podłoża hodowlanego (przede wszystkim gatunki należące do rodzaju *Myxococcus*). Często dochodzi do sytuacji, w których myksobakterie penetrują agar, wówczas kolonia rozprzestrzenia się poniżej powierzchni agaru, wnikając niekiedy w najgłębsze partie podłoża, nawet do samego dna szalki Petriego (takie przypadki obserwuje się dosyć często u gatunków z rodzaju *Polyangium*). Czasami może zdarzać się, że kolonie mogą całkowicie znikać pod powierzchnią agaru i są jedynie widoczne jako płytkie wgłębienia w powierzchni pożywki [23].

Brzeg kolonii przyjmuje często wygląd charakterystycznych wyrostków przypominających kształtem płomienie. Czasami obserwuje się szerokie, języczkowate zagłębienia (wytwarzane m.in. przez gatunki z rodzaju *Chondromyces*) lub cieniutkie niteczki tworzące brzeg kolonii, rozchodzące się promieniście od centralnej części kolonii po całej powierzchni agaru.

Niekiedy można dostrzec masywne grzbiety tworzące się na brzegu kolonii (rodzaj *Chondromyces*, *Polyangium*, *Cystobacter*). W koloniach o dużych rozmiarach większość populacji komórek może być obecna jedynie w zewnętrznych regionach (strefach brzeżnych kolonii), i jeśli nie dochodzi do wytwarzania myksospor i ciał owocujących, środek kolonii może być całkowicie pozbawiony komórek [25].

Niekiedy myksobakteryjne kolonie przybierają dość dziwny i niespotykany u innych bakterii wygląd regularnie uformowanych grzbietów lub stref pomarszczenia kolonii na powierzchni podłoża. Podczas nagrywania sekwencji filmowych cyklu życiowego bakterii z rodzaju *Myxococcus* i *Corallococcus* dokonano fenomenalnego odkrycia. Okazało się, że grzbiety te mają zdolność poruszania się w ten sposób, że całe ich zgrupowania wydają się oscylować. Od tego momentu grzbiety określono mianem oscylujących fal. Co ciekawe, prędkość poruszania się grzbietów może wzrastać lub zwalniać (średnio wynosi 2 μm/min), może dochodzić również do ich pulsowania.

Oscylujące fale odkryto po pewnym czasie u innych myksobakterii. Ich obecność obserwuje się u wszystkich przedstawicieli podrzędu *Cystobacterineae* i okazjonalnie u niektórych bakterii z podrzędu *Sorangineae*, np. z rodzaju *Chondromyces* [6, 9, 25].

5. Społeczne zachowanie myksobakterii

Myksobakterie wykazują przejawy społecznego „zachowania" ujawniającego się poprzez wspólne asymilowanie substancji pokarmowych, zbiorowe poruszanie się a także społeczny rozwój.

Myksobakterie są zdolne do altruizmu wobec komórek pozbawionych białek błonowych odpowiedzialnych za wytwarzanie struktur powierzchniowych umożliwiających poruszanie się. W tym celu myksobakterie sprawne ruchowo przekazują część swoich własnych białek błonowych niesprawnym komórkom, które nabywają w ten sposób zdolności poruszania się.

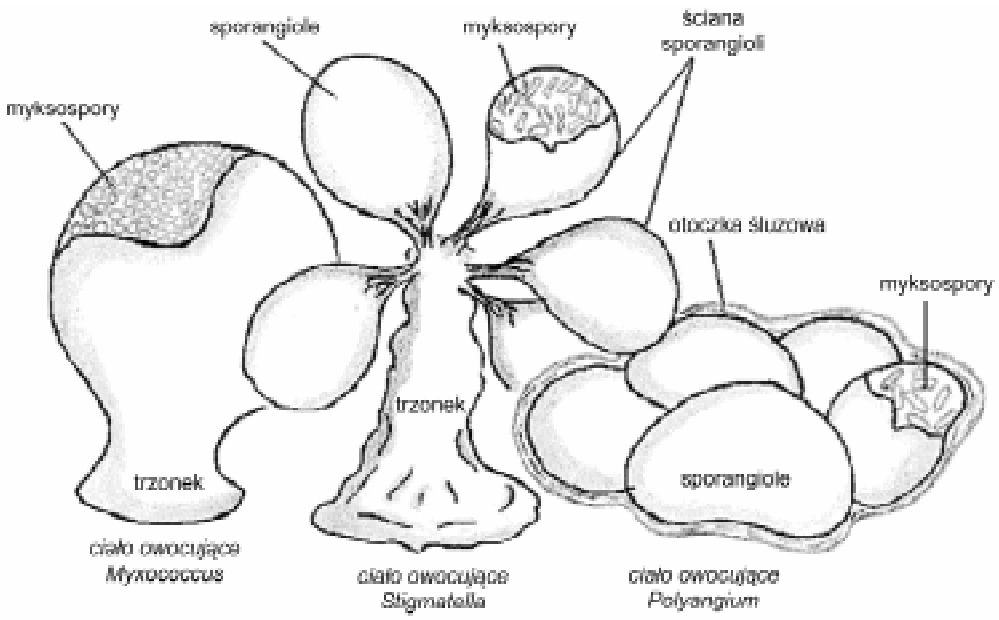
W celu łatwiejszego przemieszczania się za pokarmem a następnie trawienia go, myksobakterie tworzą zgrane grupy, niemal gangi. Wspólnie mogą bowiem wyprodukować wystarczająco dużo enzymów trawiennych [30].

Zdolność wytwarzania ciał owocujących i myksospor jest najbardziej niezwykłą i interesującą właściwością myksobakterii. Ten proces morfogenetyczny uczynił myksobakterie najbardziej wyrafinowanymi organizmami prokariotycznymi oraz obiektem znaczących zainteresowań naukowych.

Ciała owocujące zbudowane są z kulistych lub elipsoidalnych struktur, tzw. sporangioli (cyst), które mogą występować pojedynczo lub w grupach, mogą spoczywać bezpośrednio na lub w podłożu albo umieszczone są na prostych lub rozgałęzionych śluzowych trzonkach [34]. W sporangiolach gromadzone są tzw. myksospory, czyli przekształcone (skrócone i rozdęte) komórki wegetatywne niezwykle odporne na niekorzystne warunki środowiska [37].

Ciała owocujące przyjmują rozmaite kształty, charakterystyczne dla danego rodzaju a niekiedy nawet gatunku, co może stanowić bardzo pomocną cechę przy określaniu przynależności taksonomicznej poszczególnych przedstawicieli myksobakterii.

Najprostsza organizacja morfologiczna ciał owocujących występuje u przedstawicieli rodzaju *Myxococcus*, które przyjmują kształt kulisty o delikatnie śluzowej konsystencji [3]. Dosyć prostą budową charakteryzują się również ciała owocujące przedstawicieli rodzaju *Polyangium* i *Sorangium*, które zbudowane są wyłącznie z połączonych śluzem skupisk kulistych sporangioli całkowicie pozbawionych trzonków. Inne rodzaje,



Rys. 1. Budowa morfologiczna ciał owocujących myksobakterii

tj. *Corallococcus* i *Archangium* formują z kolei bardziej dziwaczne, nieregularne w kształcie ciała owocujące o konsystencji zbitego, chrząstkowatego śluzu. Przedstawiciele rodzaju *Chondromyces* i *Stigmatella* tworzą ciała owocujące o kształcie przypominającym drzewka (Rys. 1).

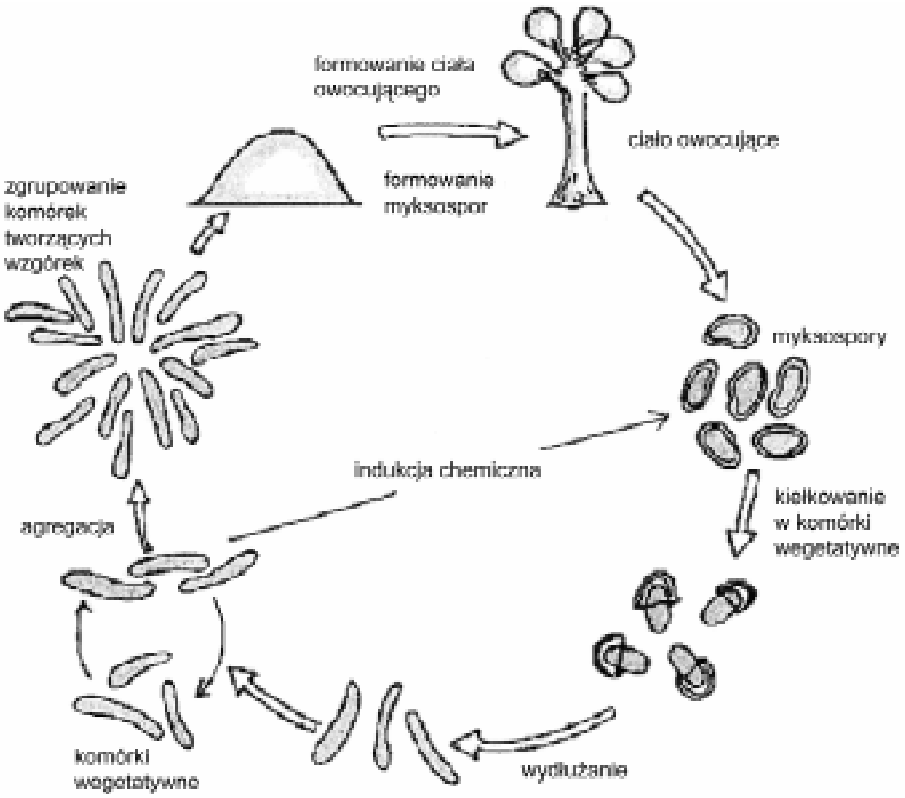
Barwa ciał owocujących może być biała, brązowa, jasnożółta, pomarańczowa, czerwona czy liliowa. Ich rozmiar waha się w granicach 10 do 100 μm, a w niektórych przypadkach nawet do 1000 μm, wskutek czego niekiedy można zaobserwować ich obecność gołym okiem.

Proces formowania ciał owocujących indukowany jest deficytem składników odżywczych w środowisku bytowania myksobakterii. Składa się na niego sekwencja następujących po sobie faz:

Pod wpływem niedoboru związków pokarmowych olbrzymia liczba komórek wegetatywnych (10^5–10^7) traci swoją fizyczną „indywidualność", wskutek czego dochodzi do zahamowania wzrostu wegetatywnego. W następnym etapie komórki wegetatywne zaczynają gromadzić się w pewnych punktach kolonii. Na powierzchni każdej z komórek tworzą się specyficzne struktury umożliwiające wzajemne łączenie się komórek na zasadzie adhezji, w efekcie czego dochodzi do utworzenia aglomeratów komórkowych. Masa gęsto upakowanych komórek (około 65–90%) ulega autolizie, formując w następstwie elementy składowe ciał owocujących charakterystycznych dla danego gatunku, tj. ściany sporangioli, śluzowe trzonki. W następnym etapie ciała owocujące dojrzewają i zaczynają przybierać ostateczny kształt. W tej fazie komórki wegetatywne znajdujące się we wnętrzu sporangioli ulegają przekształceniu w myksospory. Proces przeobrażenia komórek wegetatywnych polega na ich silnym skróceniu i rozdęciu. Zmiany kształtu są dosyć widoczne, myksospory są znacznie krótsze i grubsze aniżeli komórki wegetatywne, stają się zaokrąglone, silniej załamują światło, ulegają dehydratacji. Myksospory są okryte grubym, elektronogęstym płaszczem, zbudowanym z węglowodanów, białek i dużej ilości glicyny. Stanowią około 85 do 90% suchej masy ciał owocujących. Charakteryzuje je odporność na suszę, niskie i wysokie temperatury, silnie kwaśny i zasadowy odczyn środowiska, ultradźwięki a także na promieniowanie ultrafioletowe. W niekorzystnych warunkach środowiska potrafią przetrwać nawet do 10–25 lat. W optymalnych warunkach otoczenia następuje kiełkowanie myksospor, co wiąże się z miejscowym naruszeniem struktury płaszcza z udziałem proteaz serynowych [1, 8, 14, 15, 24, 37].

Niezwykle interesującą cechą wybranych gatunków myksobakterii jest zdolność porozumiewania się komórek wegetatywnych za pomocą chemicznych cząsteczek sygnałowych, zwanych autoinduktorami lub feromonami, umożliwiających koordynację zachowań oraz monitorowanie wielkości populacji. Zjawisko to określa się mianem *quorum sensing* (*QS*) [3, 5, 36].

Dotychczas owe zjawisko udało się szerzej poznać u gatunku *Myxococcus xanthus*, który wykorzystuje system komunikowania w kolonizacji niezasiedlonych obszarów, aktywności ruchowej a przede wszystkim w wytwarzaniu struktur przetrwalnych, tj. myksospor i ciał owocujących w odpowiedzi na deficyt substancji odżywczych [11, 12, 21]. W odpowiedzi na niedobór N, C, P oraz aminokwasów dochodzi do wzmożonej syntezy i akumulacji alarmonów odpowiedzi ścisłej, tj. tetra- i pentafosforanów guanozyny. Wysokoufos-



Rys. 2. Schemat cyklu życiowego myksobakterii

forylowana guanozyna stanowi bardzo ważną informację dotyczącą dostępności składników odżywczych (wskaźnik deficytu). Jest ona akumulowana zewnątrzkomórkowo indukując produkcję pierwszej molekuły sygnałowej, tj. Sygnału – A, który również ulega koncentracji poza komórką a poziom jego akumulacji zwiększa się wraz ze wzrostem poziomu zagęszczenia populacji komórek. Detekcja Sygnału – A następuje za pośrednictwem sensora kinazy SasS, który doprowadza do fosforylacji tzw. regulatora odpowiedzi SasR. Ufosforylowane białko SasR wraz z czynnikiem σ^{54} (białko aktywatorowe transkrypcji) aktywują geny docelowe odpowiedzialne za agregację komórek wegetatywnych, efektem czego jest powstanie olbrzymich agregatów komórek, które podlegają dalszym przemianom. W następnym etapie do działania wkracza druga molekuła sygnałowa, tj. Sygnał – C, którego aktywność ujawnia się już po 6 godzinach od wystąpienia deficytu składników odżywczych, jako efekt funkcjonowania Sygnału – A. Związane jest to z faktem, że po zakończeniu fazy agregacji zagęszczenie komórek jest wystarczająco wysokie, ażeby możliwa była ekspresja Sygnału – C umożliwiającego zajście kolejnych etapów, tj. sporulacji oraz formowania ciał owocujących. Cząsteczki Sygnału – C występujące na powierzchni jednej z komórek (białko błonowe) wchodzą w interakcję z komórką sąsiadującą posiadającą sensor Sygnału – C, umożliwiając w ten sposób komunikowanie się komórek i wywoływanie swoistej odpowiedzi. Symptomem transmisji Sygnału – C jest aktywacja białka FruA posiadającego trzy geny docelowe, tj. *frz*, *devTRS* oraz *csgA*. Gen docelowy *frz* koduje białka frizzy, które kontrolują kierunek ruchu ślizgowego komórek wegetatywnych. Drugi gen docelowy *devTRS* jest niezbędny w procesie sporulacji, z kolei trzeci gen *csgA* koduje Sygnał – C [2, 4, 8, 10, 20].

Zjawisko *quorum sensing* odkryto ponadto u innego przedstawiciela myksobakterii, tj. u gatunku *Stigmatella aurantiaca*, jednakże w tym przypadku jest ono poznane w małym stopniu. Rolę molekuły sygnałowej pełni lipid o nazwie stigmolon, który zaangażowany jest w indukcję formowania ciał owocujących [22, 35].

Tak więc, złożony system komunikacji międzykomórkowej umożliwia zajście pełnego cyklu życiowego z wytworzeniem struktur przetrwalnych i świadczy o istnieniu niezwykle fascynującego życia społecznego, gdzie każda z komórek kontaktuje się i wymienia informacje między sobą stanowiąc tym samym jeden wielki organizm.

6. Fizjologia myksobakterii oraz wytwarzanie biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych

Myksobakterie są ściśle tlenowymi organizmami mezofilnymi, preferującymi temperatury umiarkowane w zakresie 9–38°C. Wszystkie myksobakterie charakteryzuje zdolność do degradacji biologicznych

Tabela I

Substancje biologicznie czynne syntetyzowane przez myksobakterie

Substancja biologicznie czynna	Efekt działania	Gatunek myksobakterii, z której została wyizolowana
Myksosporyna	Blokowanie polimerazy RNA bakterii Gram-dodatnich	*M. fulvus*, *C. coralloides*
Koralopyronina	Blokowanie polimerazy RNA bakterii Gram-dodatnich	*C. coralloides*
Sorangicyna	Blokowanie polimerazy RNA bakterii Gram-dodatnich, w wyższych dawkach oddziaływuje również na bakterie Gram-ujemne	*S. cellulosum*
Myksowalargina	Blokowanie syntezy białek u drożdży oraz niektórych gatunków bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych	*M. fulvus*, *C. coralloides*, *A. gephyra*
Myksotiazol	Blokowanie kompleksu cytochromowego w łańcuchu oddechowym grzybów	*M. fulvus*
Myksalamid	Blokowanie kompleksu oksydoreduktaza NADH – ubichinon w łańcuchu oddechowym grzybów	*M. xanthus*
Arachina	Blokowanie kompleksu oksydoreduktaza NADH – ubichinon w łańcuchu oddechowym grzybów	*S. aurantiaca*
Epotilon	Blokowanie podziałów komórkowych komórek nowotworowych i doprowadzenie do ich śmierci na drodze apoptozy	*S. cellulosum*
Geosmina	Nadawanie charakterystycznego zapachu gleby	*N. exedens*
Pigmenty (estry kwasów tłuszczowych karotenoidów)	Nadawanie specyficznej barwy ciał owocujących	Większość gatunków myksobakterii

makrocząsteczek. Z uwagi na kryterium rozkładu celulozy myksobakterie tworzą dwie grupy:

Grupa I (organizmy celulolityczne, podrząd *Sorangineae*) charakteryzuje zdolność rozkładu celulozy i wykorzystywanie nieorganicznych związków azotowych w czasie wzrostu na celulozie i glukozie.

Grupa II, do której należy większość gatunków myksobakterii, charakteryzuje się brakiem zdolności do degradacji celulozy. Pod względem zapotrzebowania na źródło azotu, rozwój ich uzależniony jest od dopływu aminokwasów (głównie podłoża zawierające pepton). W naturalnych warunkach środowiska ta grupa myksobakterii żywi się innymi organizmami, takimi jak eubakterie czy drożdże. Wydzielane do środowiska enzymy hydrolityczne (proteazy, nukleazy, lipazy, glukanazy) niszczą komórkę ofiary, w dalszej kolejności w proces rozkładu włączają się pozostałe enzymy hydrolizujące skrobię, ksylan i chitynę. W wyniku całkowitej lizy komórek uwolnione zostają składniki odżywcze, stanowiące bazę pożywienia myksobakterii – mikropredatorów.

Do wybranych organizmów żywych atakowanych przez myksobakterie należą m.in.:

- bakterie: *E. coli*, *Micrococcus luteus*, przedstawiciele rodzaju *Azotobacter*, a także *Phormidium luridum* należąca do cyjanobakterii
- grzyby: drożdże, *Rhizoctonia solani*, *Cochliobolus miyabeanus*
- algi z rodzaju *Cladophora*

Zdolność myksobakterii do dezintegracji komórek innych mikroorganizmów przyciąga uwagę wielu naukowców. Mogą one atakować zarówno żywe jak i martwe komórki drobnoustrojów. Stwierdzono ponadto, że znaczącą rolę w zabijaniu i inaktywacji żywych organizmów mają substancje antybiotyczne [9, 25].

Około 80% biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych syntetyzowanych jest przez organizmy prokariotyczne, a około 20% tych metabolitów wytwarzanych jest przez organizmy eukariotyczne (w przeważającej mierze przez grzyby). Obecnie znanych jest około 10 000 biologicznie aktywnych związków chemicznych pochodzenia mikrobiologicznego. Myksobakterie produkują olbrzymią liczbę takich bioaktywnych cząsteczek o działaniu antybiotycznym czy zapobiegających rozwojowi komórek nowotworowych. Spośród 2150 przebadanych szczepów myksobakterii o właściwościach bakteriolitycznych – 55% wykazuje zdolności do produkcji substancji bioaktywnych, z kolei spośród 720 szczepów myksobakterii celulolitycznych – aż 95% posiada umiejętności syntezy związków biologicznie czynnych [26, 27].

W tabeli I przedstawiono kilka przykładów substancji biologicznie czynnych wytwarzanych przez myksobakterie [6].

7. Zastosowanie myksobakterii

Myksobakterie odgrywają znaczącą rolę w przyrodzie ze względu na wysoką aktywność enzymatyczną. Bakteriolityczne właściwości myksobakterii mogą być skutecznym narzędziem w walce z wieloma szkodliwymi drobnoustrojami, m.in. cyjanobakteriami, stanowiąc tym samym szansę ochrony ekosystemów

wodnych przed zakwitami wód wywoływanymi przez owe bakterie.

Myksobakterie są także użyteczne jako organizmy wskaźnikowe, czyli tzw. bioindykatory, przede wszystkim w środowisku wodnym. Są to mikroorganizmy bardzo czułe na wszelkie zmiany w środowisku wywołane wzrostem koncentracji czynników zanieczyszczających, objawiające się zmniejszeniem zagęszczenia populacji komórek i intensywnym formowaniem struktur prztrwalnych.

Myksobakterie mogą być również wykorzystywane jako bogate źródło różnorodnych enzymów. Dość użyteczne wydają się endonukleazy restrykcyjne i specyficzne proteazy, które mogą znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, m.in. biochemii czy biotechnologii.

Najbardziej obiecującym przykładem biotechnologicznych zastosowań myksobakterii jest wykorzystanie metabolitów wtórnych, a w szczególności związków chemicznych o biologicznej aktywności, takich jak antybiotyki i inne inhibitory. Mimo, że zdolność myksobakterii do syntezy antybiotyków znana jest od ponad pół wieku, pomijając proste kwasy tłuszczowe uczestniczące w inhibicji kiełkowania zarodników grzybów, dopiero niedawno poznano ich strukturę chemiczną. Pierwszym myksobakteryjnym antybiotykiem o wyjaśnionej strukturze chemicznej była ambrucytyna, silna substancja przeciwgrzybicza izolowana z gatunku *S. cellulosum*. Z gatunku *M. xanthus* wyizolowano z kolei antykoagulant krwinek czerwonych, tzw. myksalinę, która jest glikopeptydem odpornym na wysokie temperatury.

Jedną z najważniejszych substancji biologicznie czynnych stanowiących potencjalne narzędzie w walce z rakiem jest epotilon, wytwarzany przez gatunek *S. cellulosum*. Jego działanie polega na niszczeniu wrzecion podziałowych w komórkach nowotworowych, wskutek czego dochodzi do zahamowania podziałów komórkowych i w następstwie zapobieganie rozrostowi guzów, m.in. jelit, piersi czy jajników [9, 25].

8. Podsumowanie

Myksobakterie są mikroorganizmami specyficznymi i fascynującymi w swojej biologii. Wykazują bardzo wysoki poziom aktywności enzymatycznej, zarówno w rozkładzie komponentów drewna jak również komórek innych drobnoustrojów. Jako jedyni przedstawiciele organizmów prokariotycznych formują niespotykane dotąd struktury przetrwalne określane mianem ciał owocujących, we wnętrzu których gromadzone są myksospory o wysokim stopniu odporności na niekorzystne warunki otoczenia. Myksobakterie stanowią bogate źródło biologicznie czynnych metabolitów wtórnych, spośród których wiele może znaleźć zastosowanie w medycynie.

Piśmiennictwo

1. Baj J., Markiewicz Z.: Biologia molekularna bakterii. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2006
2. Bassler B.L.: Cell-to-cell communication in bacteria: a chemical discourse. *Harvey Lect.* **100**, 123–142 (2006)
3. Bassler B.L., Losick R.: Bacterially speaking. *Cell*, **125**, 237–246 (2006)
4. Ben-Jacob E., Becker I., Shapira Y., Levine H.: Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends Microbiol*. **12**, 366–372 (2004)
5. Camilli A., Bassler B.L.: Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, **311**, 1113–1116 (2006)
6. Dawid W.: Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 403–427 (2000)
7. Dworkin M.: Recent advantages in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **60**, 70–102 (1996)
8. Dwokin M., Gibson S.M.: A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus Xanthus*. *Science*, **146**, 234–244 (1964)
9. Dworkin M., Kaiser D.: Myxobacteria II, American Society for Microbiology Press, Washington, 1993
10. Federle M.J., Bassler B.L., Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* **112**, 1291–1299 (2003)
11. Hodgson D.A., Thomas C.M., Signals, switches, regulons, and cascades: control of bacterial gene expression. Cambridge University Press, Cambridge, 2002
12. Holloway M.: Talking bacteria. *Sci. Am.* **290**, 34–35 (2004)
13. Kaiser D.: Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus Xanthus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5952–5956 (1979)
14. Kaiser D.: Multicellular development in myxobacteria (w:) Genetics of Bacterial Diversity, red. A. Hopwood, K.F. Chater, Academic Press, London, 1989, s. 243–263
15. Kaiser D., Manoil C., Dworkin M.: Myxobacteria: cell interactions, genetics and development. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**, 595–639 (1979)
16. Krzemieniewska H., Krzemieniewski S.: Miksobakterje Polski. Uzupełnienie, *Acta Soc. Botan. Polon.* **5**, 79–98 (1927)
17. Krzemieniewska H., Krzemieniewski S.: Rozsiedlenie miksobakteryj. *Acta Soc. Botan. Polon.* **5**, 102–139 (1927)
18. Krzemieniewska H., Krzemieniewski S.: Morphologja komórki miksobakteryj. *Acta Soc. Botan. Polon*. **5**, 46–90 (1928)
19. Lünsdorf H., Reichenbach H.: Ultrastructural details of the apparatus of gliding motility of *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*). *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1633–1641 (1989)
20. McCormack J.: Quorum sensing, bacterial communication and new antibiotics. *Intern. Med. J.* **36**, 757–758 (2006)
21. Miller M.B., Bassler B.L., Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*. **55**, 165–199 (2001)
22. Plaga W., Stamm I., Schairer H.U.: Intercellular signaling in *Stigmatella aurantiaca*: Purification and characterization of stigmolone, a myxobacterial pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11263–11267 (1998)
23. Reichenbach H.: The myxobacteria: common organisms with uncommon behaviour. *Microbiol. Sci*. **3**, 268–274 (1986)
24. Reichenbach H., Dworkin M.: Introduction of myxospore formation in *Stigmatella aurantiaca* (*Myxobacterales*) by monovalent cations. *J. Bacteriol*. **101**, 325–326 (1970)
25. Reichenbach H., Dworkin M.: The myxobacteria (w:) The Prokaryotes, red. K.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Belows, H.G. Schlegel, Springer, New York, vol. 4, 1991, s. 3415–3487

26. Reichenbach H., Höfle G.: The gliding bacteria: a treasury of secondary metabolites (w) Bioactive Metabolites from Microorganisms, red. M.E. Bushell, E. Gräfe, Elsevier, Amsterdam, 1989, s. 79–100
27. Reichenbach H., Höfle G.: Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotechnol. Adv*. **11**, 219–277 (1993)
28. Rosenberg E.: Myxobacteria. Development and Cell Interactions, Springer, New York, 1984
29. Rückert G.: Myxobakterien (*Myxobacterales*) auf Blattoberflächen. *Z. Allg. Mikrobiol.* **21**, 761–763 (1981)
30. Shimkets L.J.: Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev*. **54**, 473–501 (1990)
31. Shimkets L.J., Dworkin M., Reichenbach H.: The myxobacteria (w) The Prokaryotes, vol. 7, 3rd ed., red. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt, Springer Verlag, Heidelberg, 2006, s. 31–118
32. Singh B.N.: Myxobacteria in soils and composts: their distribution, number and lytic action on bacteria. *J. Gen. Microbiol*. **1**, 1–10 (1947)
33. Sliusarenko O., Chen J., Oster G.: From biochemistry to morphogenesis in myxobacteria. *Bull Math Biol*. **68**, 1039–1051 (2006)
34. Sozinova O., Jiang Y., Kaiser D., Alber M.: A three-dimensional model of myxobacterial fruiting-body formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17255–17259 (2006)
35. Waters C.M., Bassler B.L.: Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. **21**, 319–346 (2005)
36. West S.A.: Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol*. **4,** 597–607 (2006)
37. White D.: Myxospore and fruiting body morphogenesis (w:) Myxobacteria II, red. M. Dworkin, D. Kaiser, American Society for Microbiology, Washington, 1993, s. 307–332

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 225–234
http://www.pm.microbiology.pl

METODY BIOINDYKACYJNE W OKREŚLANIU WPŁYWU PESTYCYDÓW NA MIKROFLORĘ GLEBY

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Andrzej Nowak

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Akademia Rolnicza
ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, tel.+48 91 4250234, e-mail: Andrzej.Nowak@agro.ar.szczecin.pl

1. Wprowadzenie 2. Ocena wpływu pestycydów na liczebność mikroorganizmów w glebie 3. Ocena wpływu pestycydów na aktywność mikroorganizmów w glebie. 4. Znaczenie efektów ubocznych pestycydów na mikroflorę gleby. 5. Podsumowanie

Bioindication methods in determination of the effect of pesticides on soil microflora

1. Introduction 2. Evaluation of the effect of pesticides on microorganisms count in soil 3. Evaluation of the effect of pesticides on microorganisms activity in soil 4. Importance of pesticide side-effects on soil microflora 5. Summary

Słowa kluczowe: aktywność mikroflory, efekty uboczne, gleba, pestycydy
Key words: microflora activity, side-effects, soil, pesticides

1. Wprowadzenie

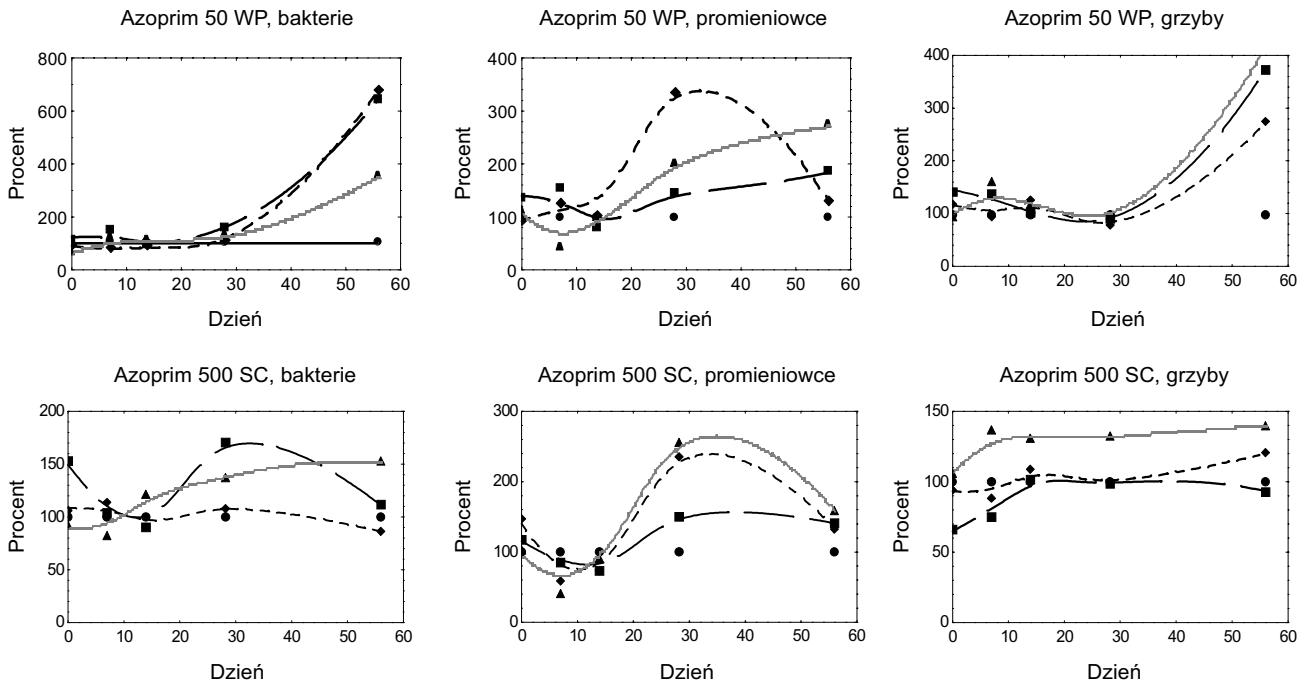
Wśród licznych substancji, które dostają się do środowiska na skutek działalności człowieka, pestycydy stanowią szczególny przypadek. Wynika to z dwóch powodów. Po pierwsze, są one substancjami opracowanymi i produkowanymi specjalnie w celu niszczenia żywych organizmów. Po drugie od licznych innych polutantów odróżnia je to, że nie dostają się do środowiska przypadkowo, w sposób niezamierzony, lecz są tam wprowadzane świadomie i celowo.

Jako substancje o dużej aktywności biologicznej, pestycydy wywierają poza zamierzonym działaniem, którym jest zniszczenie chwastów, szkodników roślin i patogenów, także liczne efekty uboczne. Należy do nich eliminowanie organizmów nie będących celem działania, toksyczność dla zwierząt i ludzi, nagromadzanie się w łańcuchach pokarmowych, wreszcie – różnorodne oddziaływania na mikroflorę gleby. Te ostatnie mają podstawowe znaczenie dla stanu i żyzności gleby, ponieważ mikrobiologiczne przemiany w tym środowisku są w około 80% odpowiedzialne za niezakłócony przebieg metabolizmu gleby – cykli krążenia pierwiastków i przepływ energii – a w konsekwencji tworzenie i utrzymanie żyzności gleby.

2. Ocena wpływu pestycydów na liczebność mikroorganizmów w glebie

Początkowo ocena wpływu preparatów ochrony roślin na mikroflorę gleby polegała na określaniu wrażliwości wyizolowanych z niej szczepów bakterii, promieniowców lub grzybów na poszczególne preparaty oraz na badaniu zmian liczebności mikroflory występujących pod wpływem tych związków (Rys. 1). Nie można oczywiście stwierdzić, że badania takie niewiele wnosiły do poznania problemu. Udało się wielokrotnie stwierdzić znaczne przesunięcia w składzie gatunkowym mikroflory, występujące pod wpływem pestycydów zubożenie różnorodności gatunkowej, czy też ustalić wrażliwość wielu gatunków na szereg różnych pestycydów [9, 10]. Ciągle jednak pozostawał pewien niedosyt. Czy bowiem eliminacja niektórych gatunków z mikroflory i wejście na ich miejsce innych stanowi znaczne zagrożenie dla środowiska glebowego? Podobne lub zbliżone uzdolnienia metaboliczne ma duża ilość gatunków występujących w mikroflorze gleby. Odporne na pestycyd mogą łatwo przejąć funkcje wykonywane dotychczas przez wrażliwe, eliminowane. Dodatkowo, wywołany przez preparat nacisk selekcyjny powoduje uzyskanie potrzebnych, nowych cech metabolicznych przez te szczepy, które ich nie miały. Jest to możliwe na drodze mutacji lub też powszechnych u bakterii procesów paraseksualnych, polegających na wymianie pomiędzy komórkami odcinków DNA. Dobrze znanym przykładem takiego zjawiska jest lawinowe rozszerzanie się w populacji oporności na antybiotyki.

Tak więc, przesunięcia gatunkowe w sposób ograniczony informują, co zmienia się w funkcjonowaniu mikroflory a zwłaszcza w metabolizmie gleby. Dodatkowym utrudnieniem jest niejednoznaczność uzyskiwanych danych. W różnych badaniach ten sam pestycyd działa w odmienny sposób. Jeden autor stwierdza wpływ hamujący, inny zaś brak wpływu, lub nawet stymulację. Na jednej glebie notowano duże działanie, na innej – niewielkie. Jak w takim razie zakwalifikować zagrożenie ze strony tego pestycydu? Pojawiła się potrzeba opracowania nowych testów, które



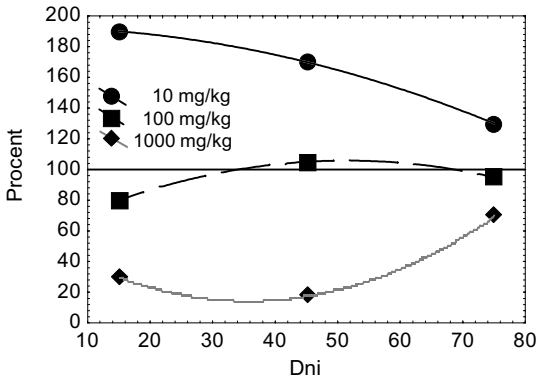
Rys. 1. Zmiany liczebności grup taksonomicznych mikroorganizmów w glebie pod wpływem herbicydów (badania własne)
● kontrola; ■ 1 mg* kg^{-1}; ♦ 10 mg* kg^{-1}; ▲ 100 mg* kg^{-1}

mogłyby syntetycznie ująć i przedstawić oddziaływania uboczne środków ochrony roślin możliwie w formie wskaźnika liczbowego a równocześnie obejmować pomiary i analizy takich zjawisk czy procesów mikrobiologicznych, które mają istotne znaczenie dla środowiska glebowego.

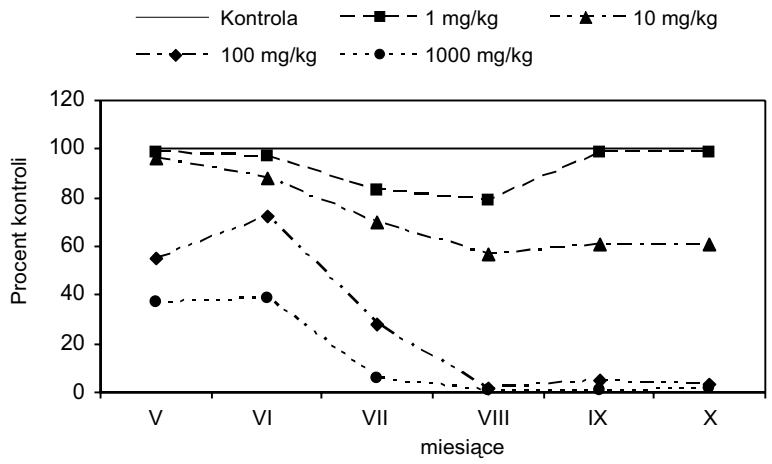
3. Ocena wpływu pestycydów na aktywność mikroorganizmów w glebie

Stosunkowo dawno badacze zaczęli stosować pomiary różnych przejawów aktywności drobnoustrojów w glebie do oceny wpływu pestycydów na mikroflorę. Takie podejście opiera się na założeniu, że nie ilość mikroorganizmów, nie skład gatunkowy mikroflory jest rzeczą istotną, lecz jej aktywność i zdolność do przeprowadzania przemian związanych z utrzymaniem żyzności gleby. Przedmiotem zainteresowania stały się więc zachodzące pod wpływem pestycydów zmiany w przebiegu najważniejszych elementów cykli krążenia pierwiastków, jak mikrobiologiczny rozkład materii organicznej w glebie, przebieg wiązania azotu przez asymilatory wolno żyjące i symbiotyczne, amonifikacja czy też nitryfikacja [4, 15]. Badania liczebności bakterii, promieniowców czy grzybów zostały zastąpione określaniem ilości drobnoustrojów z różnych grup fizjologicznych, zdolnych do hydrolizowania białek, tłuszczu, węglowodanów, celulozy itp. (Rys. 2, 3). Podjęte zostały też próby określania zmian profilu metabolicznego gleby (Rys. 4), a więc procentowego udziału w mikroflorze drobnoustrojów o różnych uzdolnieniach metabolicznych [9].

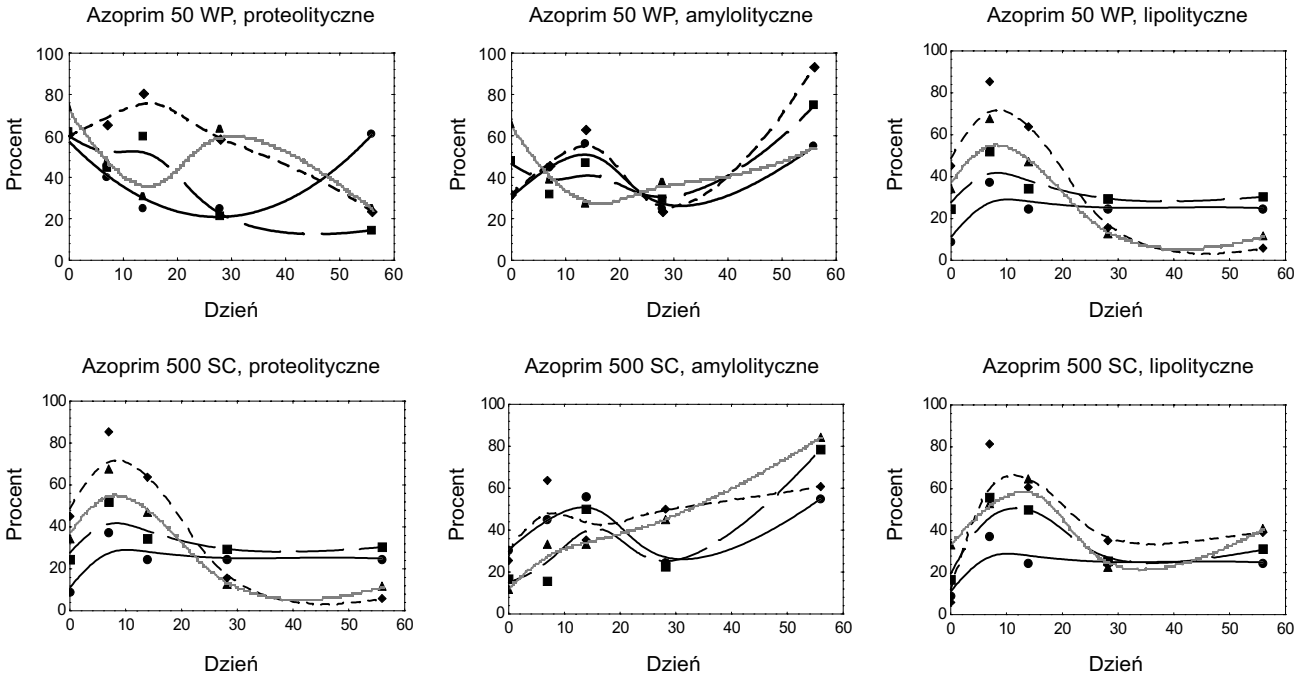
Jako najogólniejszy wskaźnik nie tylko ilości, ale również aktywności mikroflory i nasilenia prowadzonych przez mikroorganizmy przemian stosowane są pomiary oddychania gleby, poprzez oznaczanie ilości pochłanianego tlenu lub wydzielanego dwutlenku węgla. Z reguły mikroflora reaguje zmianą intensywności oddychania po wprowadzeniu do gleby pestycydów. Kłopot polega na tym, że w takiej glebie obserwuje się zwykle całą sekwencję zmian, w której okresy zmniejszonej intensywności i stymulacji występują na przemian, zgodnie z rozwojem różnych grup drobnoustrojów. Trudno więc stwierdzić jedno-



Rys. 2. Ilość celulozy rozłożonej w glebie zadanej zestawem pestycydów stosowanych w uprawie pszenicy ozimej (Dicuran + U-46 KV + Bidisin + Metasystox R + Derosal + Cercobin) (badania własne)



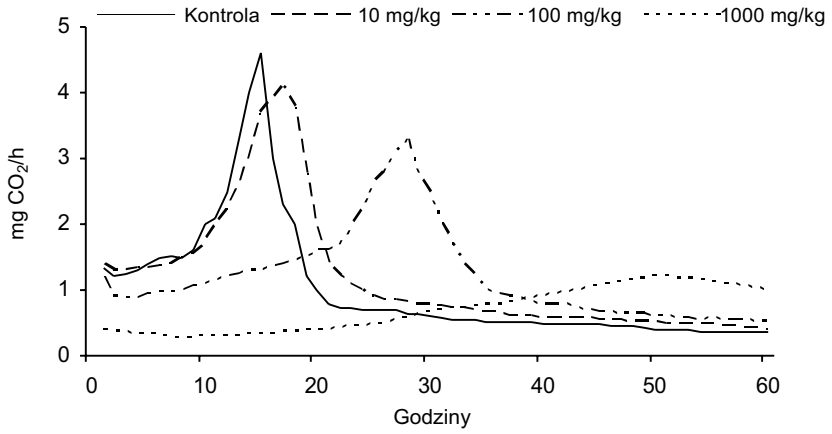
Rys. 3. Przebieg nitryfikacji w glebie zadanej zastawem preparatów stosowanych w uprawie ziemniaka (Dithane M45, Linuron 50 WP, Fusilade Super, Decis 2,5 EC, Ridomil MZ 72 WP, Bravo 500 S.C., Miedzian 50 WP, Reglone 200 SL) (badania własne)



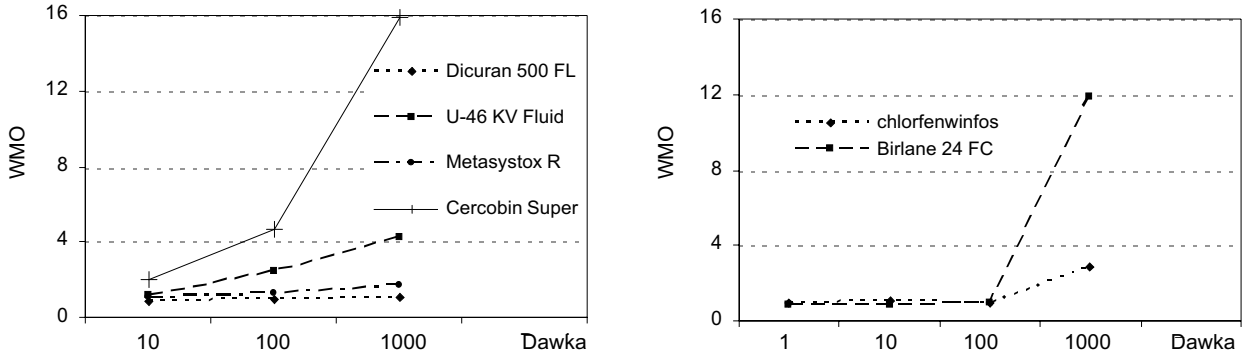
Rys. 4. Zmiany liczebności grup fizjologicznych mikroorganizmów w glebie pod wpływem herbicydów (badania własne)
● kontrola; ■ 1 mg* kg^{-1}; ♦ 10 mg* kg^{-1}; ▲ 100 mg* kg^{-1}

znacznie, jaki jest wpływ pestycydu a zwłaszcza jaka jest wielkość tego wpływu.

Aby uzyskać jednoznaczną odpowiedź co do rodzaju i wielkości oddziaływania, można określić współczynnik modyfikacji oddychania gleby zadanej pestycydem. Po dodaniu do gleby łatwo przyswajalnego substratu, dostępnego dla wszystkich drobnoustrojów, obserwuje się wzmożony metabolizm i namnażanie mikroorganizmów. Skutkiem tego jest szybko narastająca ilość wydzielanego CO_2, pochodzącego z tego właśnie substratu. Dopiero w momencie wykorzystania całej ilości substratu, wydzielanie CO_2 gwałtownie maleje. Krzywa obrazująca wydzielanie dwutlenku węgla ma kształt piku z wyraźnie zaznaczonym punktem maksimum (Rys. 5). W glebie, do której dodano pestycyd, jeśli mikroflora zostanie zmniejszona lub jej aktywność spadnie, przebieg wspomnianej krzywej jest bardziej płaski a maksimum jest mniejsze i występuje później. (Jeśli mikroflora jest stymulowana – obraz jest odwrotny.) Efekt ten narasta z narastającym działaniem hamującym, np. wraz z rosnącą dawką pestycydu. Tak więc, im silniejszy wpływ preparatu, tym mniejsze jest maksimum i tym później się pojawia a im bardziej działa on stymulująco, tym maksimum na krzywej oddychania jest większe i występuje wcześniej [5]. Powiązanie parametrów maksimum na krzywej



Rys. 5. Krzywe oddychania gleby zadanej różnymi dawkami kombinacji herbicydów U 46 KV i Bidisin Forte (badania własne)



Rys. 6. Współczynniki modyfikacji oddychania. Po lewej: różnych pestycydów [5], po prawej: różnych form aplikacyjnych tej samej substancji aktywnej (badania własne)

oddychania w jeden wskaźnik pozwala obliczyć współczynnik modyfikacji oddychania wg wzoru:

$$WMO = \frac{T_p \times H_k}{T_k \times H_p}$$

w którym:

T_k – czas wystąpienia maksimum na krzywej oddychania dla próbki kontrolnej (h)

H_k – wielkość maksimum na krzywej oddychania dla próbki kontrolnej (mg CO_2/h)

T_p – czas wystąpienia maksimum na krzywej oddychania dla próbki z pestycydem (h)

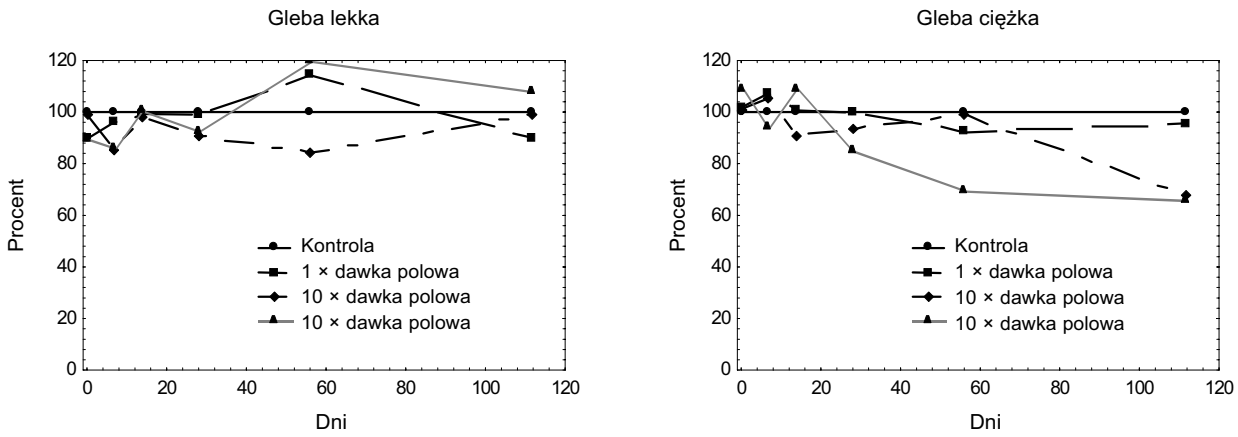
H_p – wielkość maksimum na krzywej oddychania dla próbki z pestycydem (mg CO_2/h)

Działanie pestycydu na mikroflorę można więc ująć postaci współczynnika, którego wartość kształtuje się pomiędzy 0 i 1. W przypadku stymulacji mikroflory przez pestycyd, współczynnik przybiera wartości mniejsze od 1, natomiast im bardziej wartość współczynnika przekracza 1, tym silniejsze jest działanie hamujące pestycydu [3, 5] (Rys. 6).

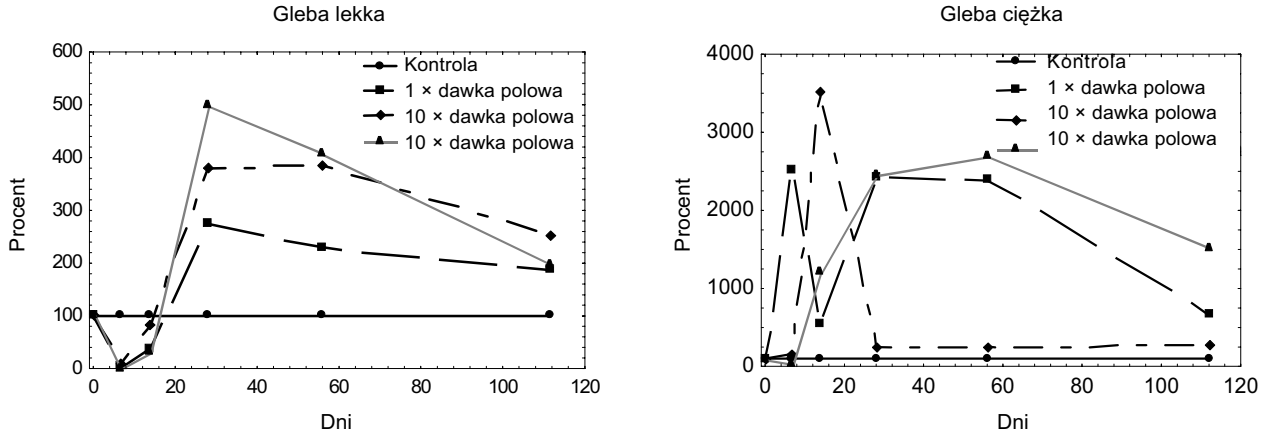
Wskaźnikiem nieco zbliżonym do intensywności oddychania jest zawartość biomasy żywych mikroorganizmów w glebie (Rys. 7). Ujmuje on także równocześnie ilość jak i aktywność mikroflory, gdyż ze względu na stosowaną metodykę (metoda fizjologiczna SIR) podaje informację o żywych, aktywnych metabolicznie komórkach drobnoustrojów. Zmiana ilości biomasy żywych mikroorganizmów w glebie pod wpływem pestycydu powinna być niewątpliwie zjawiskiem niepokojącym, jednak najczęstszy zakres tej zmiany w granicach kilku-kilkunastu procent nie skłania do podnoszenia alarmu [13].

Kolejnym wskaźnikiem o podobnym charakterze jest pomiar ilości ATP, substancji związanej z funkcjonowaniem żywej komórki (Rys. 8). W obecności pestycydów można ustalić zmiany ilości ATP w glebie, niewątpliwie spowodowane wpływem tego preparatu na żywe komórki drobnoustrojów [13].

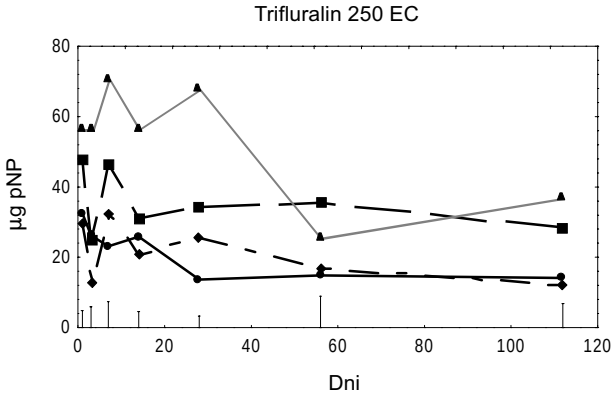
Innym sposobem na pomiar zmian wielkości i funkcjonowania mikroflory może być pomiar aktywności enzymów glebowych, zwłaszcza dehydrogenaz (Rys. 9). Wszystkie enzymy glebowe pochodzą oczywiście z żywych komórek a dehydrogenazy są szczególnie silnie z nimi związane, jako katalizatory biorące udział w procesach oddechowych. Tak więc wyniki oznaczeń tych enzymów mogą być również miarą wielkości i aktywności mikroflory w glebie [14].



Rys. 7. Zmiany ilości biomasy żywych mikroorganizmów w glebach pod wpływem Isoproturon (badania własne)



Rys. 8. Zmiany ilości ATP w glebach pod wpływem Isoproturon (badania własne)

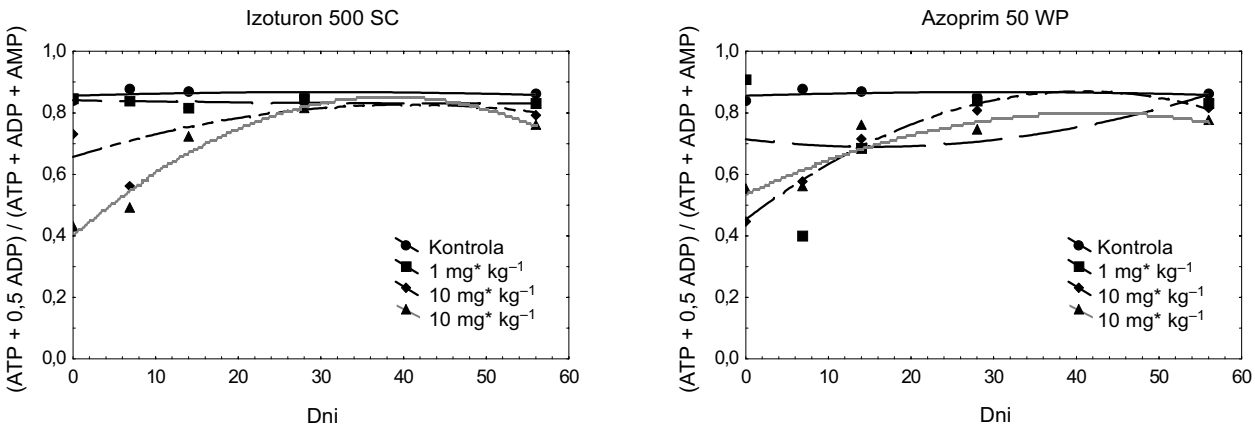


Rys. 9. Zmiany aktywności dehydrogenazy w glebie zadanej herbicydem Trifluraliną (badania własne)

Dalszym rozwinięciem metody oceny przez analizę ilości ATP jest określenie ładunku energetycznego (Rys. 10). Ten wskaźnik informuje nie tylko o wielkości mikroflory, jej aktywności, ale także pozwala ocenić jej kondycję i kierunek przebiegu procesów metabolicznych w komórkach. Możliwe jest stwierdzenie czy mikroflora w obecności pestycydu znajduje się w stanie zastoju metabolicznego, podlega działaniu toksycznemu czy też znajduje się w okresie intensywnego metabolizmu [10].

Wszystkie ostatnio wymienione wskaźniki, a więc oddychanie gleby, ilość biomasy żywych mikroorganizmów, ilość ATP czy aktywność dehydrogenaz a nawet ładunek energetyczny mogą wskazywać na wielkość i aktywność mikroflory, pokazując niejako tą samą rzecz z różnych stron. Wydaje się jednak, że wskazują tą wielkość w sposób niejednakowy, albo też wskazują jej różne aspekty. Do takiego wniosku skłania fakt, że przeprowadzone badania wykazały, że istnieje zwykle tylko bardzo niska korelacja pomiędzy tymi wskaźnikami (Tab. I). Niewielka jest też korelacja pomiędzy nimi a ilością pozostałości pestycydu, wg zasady: większa dawka pestycydu – większe stężenie – silniejsze działanie na mikroflorę – większa zmiana wartości wskaźników [10, 12, 13].

Czy więc wskaźniki nie są przydatne do oceny efektów pestycydowych? Dlaczego nie wskazują podobnych tendencji? W rzeczywistości wszystkie one wskazują wbrew pozorom – różne zjawiska. Przede wszystkim jednak wskazują średnią, przeciętną wartość z ogromnego bogactwa przemian zachodzących



Rys. 10. Zmiany ładunku energetycznego w glebach pod wpływem różnych herbicydów (badania własne)

w glebie. Weźmy dla przykładu przypadek najprostszy, rozważając teoretycznie. Przyjmijmy, że pestycyd zabija połowę komórek mikroorganizmów w glebie. Zwolnione miejsce zajmą szczepy odporne, powiększając swoją liczebność. Po takiej operacji pomiar oddychania wykaże brak zmian w stosunku do pierwotnej mikroflory. Ilość biomasy nie zmieni się również albo ze względu na młodszy wiek komórek uzyskana wartość nieco wzrośnie. Aktywność dehydrogenazy powie o wielkości zapasu tego enzymu w glebie, uzbieranego w ostatnim okresie i jego aktywności wyznaczanej aktualnymi wartościami parametrów fizykochemicznych gleby. Ilość ATP prawdopodobnie wzrośnie ze względu na zwiększoną zawartość młodych, intensywnie rosnących komórkach, ładunek energetyczny wykaże wzrost intensywności procesów anabolicznych. Jakie wartości wykażą pomiary zależy też w znacznej mierze od momentu wykonania: natychmiast po aplikacji pestycydu, w trakcie odtwarzania mikroflory czy też po jej ustabilizowaniu. Tak więc, nawet w tak prostym przypadku każdy wskaźnik w sposób uprawniony pokaże inny obraz. A przecież w glebie procesy zachodzące po zadaniu pestycydem są o wiele bardziej złożone. Dziwne byłoby raczej, gdyby wszystkie wskaźniki pokazywały to samo. Do czego się w takim razie mogą przydać? Mogą pomóc wyjaśnić, co dzieje się w mikroflorze po zadaniu pestycydem, pod warunkiem, że dysponujemy wynikami oznaczenia nie jednego – lecz kilku różnych takich wskaźników, możliwie w funkcji czasu i poddamy je krytycznej ocenie. Pojedynczy wskaźnik i pojedynczy pomiar niewiele powie o zmianie stanu mikroflory. Może natomiast być użyty do oceny siły działania pestycydu a raczej porównywania pod tym względem różnych preparatów.

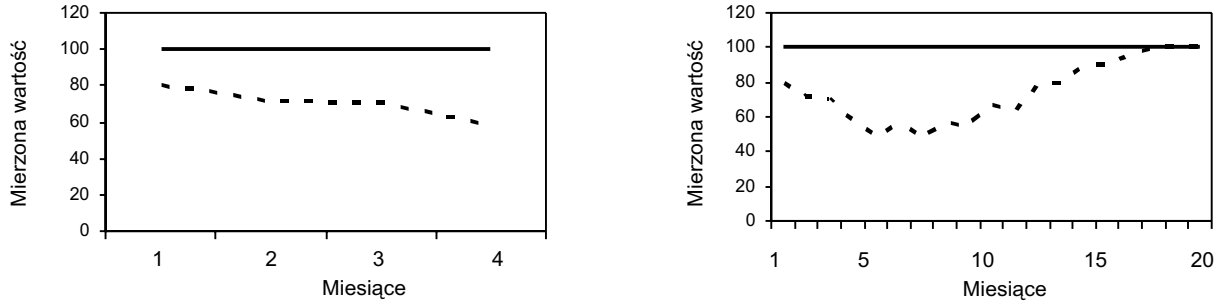
Do oceny stopnia zagrożenia stwarzanego przez pestycyd dla funkcjonowania gleby natomiast należałoby wykorzystywać wspomniane wyżej pomiary skutków działania mikroorganizmów – a więc szybkość mineralizacji materii organicznej czy nitryfikacji. Jak jednak oceniać stopień zagrożenia, np. czy groźne jest zmniejszenie szybkości mineralizacji o 10%? Może o 20% albo dopiero o 40%?

Jedynym dopracowanym sposobem takiej oceny jest koncepcja przedstawiona przez D o m s c h a [1]. Polega ona na wartościowaniu znaczenia wpływu wywieranego przez pestycydy na mikroflorę gleby przez

T a b e l a I

Korelacja pomiędzy wskaźnikami określającymi wielkość i aktywność mikroflory glebowej (badania własne)

	Isoproturon				Izoproturon	Atrazyna	Lontrel 30SL			Mustang 306 SE		Solar 200 EC	
	Biomasa	Dehydrogenazy	ATP	Pozostałość	Pozostałość	Pozostałość	Biomasa	Dehydrogenazy	ATP	Biomasa	Dehydrogenazy	Biomasa	Dehydrogenazy
Biomasa		–0,62		–0,31				0,82	0,52		0,51		–0,33
Dehydrogenazy	–0,62		–0,59				0,82		0,72	0,51		–0,33	
ATP		–0,59					0,52	0,72					
Ładunek energetyczny					–0,79	–0,36							
Pozostałość	–0,59												



Rys. 11. Wpływ długości okresu badań na możliwość interpretacji wyników

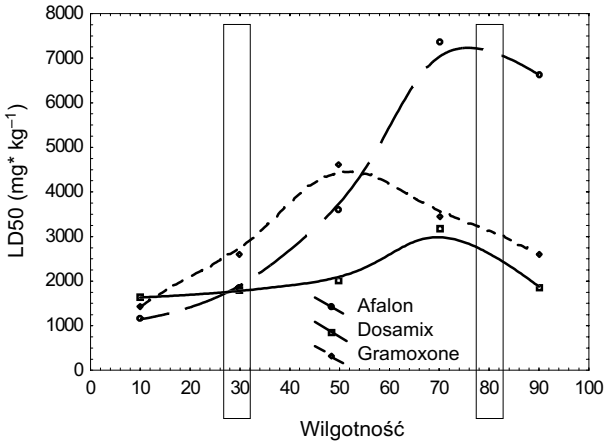
porównanie stresu wywoływanego przez pestycyd ze stresami występującymi na skutek działania naturalnych czynników środowiskowych. Tak długo, jak stresy pestycydowe nie są większe niż naturalne – nie należy ich uznawać za niebezpieczne.

W warunkach naturalnych szereg czynników ogranicza rozwój mikroorganizmów. Brak substratów pokarmowych, brak tlenu (dla tlenowców), zmiany pH, wahania temperatury, zmiany wilgotności. Każdy z nich może powodować istotne ograniczenie rozwoju drobnoustrojów, które jednak szybko ustaje po ustaniu przyczyny, jaka to ograniczenie wywołała. Szybkość odtworzenia mikroflory po stresie jest znaczna, wg D o m s c h a czas podwojenia ilości biomasy lub liczby mikroorganizmów wynosi średnio 10 dni. Tak więc, po drastycznym zmniejszeniu ilości mikroorganizmów w glebie, np. podczas suszy, kiedy to ginie ponad 90 procent komórek, czas odtworzenia po ponownym nawilżeniu gleby wynosi około miesiąca. Porównywalne efekty działania pestycydów należy więc uznać za dopuszczalne.

4. Interpretacja znaczenia efektów ubocznych pestycydów na mikroflorę gleby

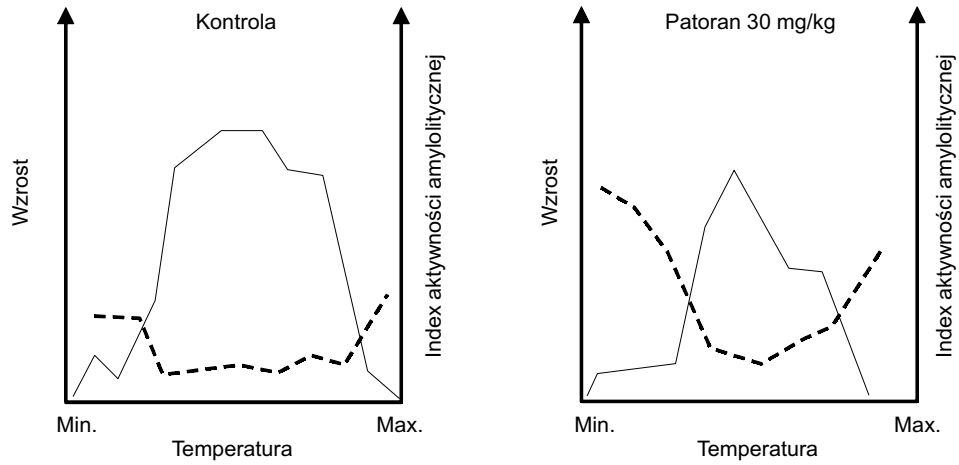
Każdy efekt (stres) można opisać dwoma parametrami określającymi jego wielkość (nasilenie) i czas trwania [1]. Na podstawie badań i analizy literatury, Domsch przedstawił schemat oceny takich wpływów i zakwalifikowania ich do kategorii: nieistotnych, dopuszczalnych i krytycznych.

Niestety, większość relacjonowanych w literaturze badań nie pozwala na wysnucie jakichkolwiek wniosków z tego punktu widzenia. Najczęściej bowiem, nie jest możliwe ustalenie ani wielkości oddziaływania, ani też jego czasu trwania. Nie powinno się, jak to jest spotykane, obserwować np. zmian nitryfikacji przez 2 tygodnie i na tej podstawie ustalić działania pestycydu. Doświadczenie powinno trwać tak długo, aż efekt występujący pod wpływem pestycydu pojawi się a następnie całkowicie ustąpi, co wymaga zwykle 3–8 tygodni. Podobnie w przypadku innych doświadczeń – należy je prowadzić aż do momentu powrotu mierzonej wartości do stanu wyjściowego lub całkowitego ustabilizowania się sytuacji. W innym przypadku uzyskujemy dane przypadkowe (Rys. 11).

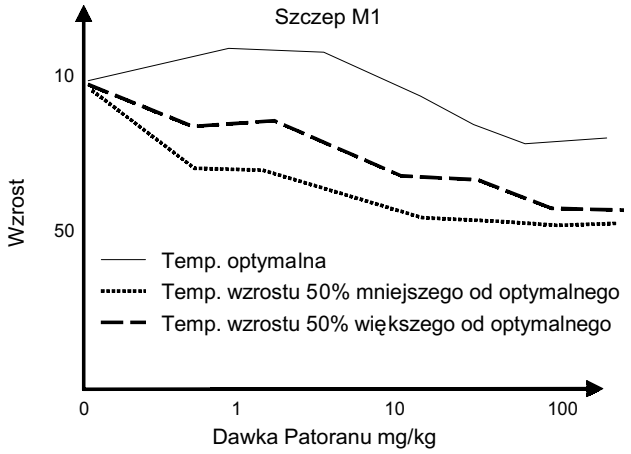


Rys. 12. Zmiany wartości LD_{50} mikroflory, mierzone ilością biomasy żywych mikroorganizmów dla różnych preparatów w zależności od uwilgotnienia gleby (badania własne)

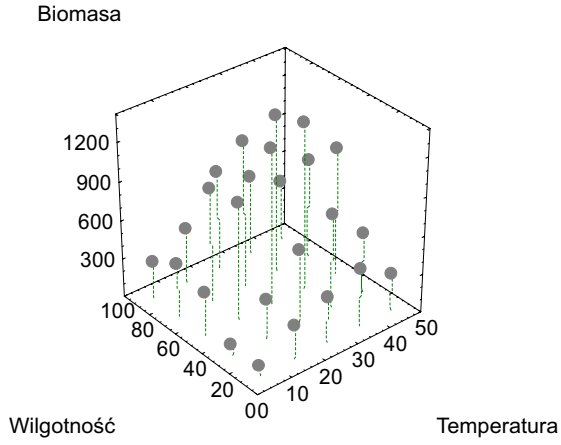
Niezwykle ważne jest też, w jakich warunkach prowadzimy pomiary czy inkubację gleby. Parametry takie jak np. temperatura czy wilgotność mogą diametralnie zmieniać reakcję poszczególnych gatunków i całej mikroflory na pestycydy [8] (Rys. 12). Weźmy za przykład temperaturę. Każdy szczep bakterii czy gatunek grzyba ma swoje własne wymagania pod tym względem, temperaturę minimalną, maksymalną i optymalną. Liczne badania wykazały, że wrażliwość na pestycydy jest najmniejsza w temperaturze optymalnej a zwiększa się w miarę oddalania się od optimum w kierunku temperatury minimalnej lub maksymalnej. Porównując więc dwa szczepy w jednej temperaturze możemy stwierdzić ich jednakową wrażliwość, ale dla jednego z nich może to być temperatura optymalna a dla drugiego zbliżona do minimum. W tan sposób porównanie daje błędny wynik [6] (Rys. 13). Właściwe jest ustalenie najpierw reakcji obydwu szczepów na temperaturę a dopiero potem wykonanie pomiaru wpływu oddziaływania pestycydu na jeden szczep we właściwej dla niego temperaturze optymalnej i na drugi



Rys. 13. Wpływ temperatury na wzrost i aktywność amylolityczną promieniowców glebowych (badania własne)



Rys. 14. Wpływ rosnących dawek Patoranu na wzrost szczepu M-1 promieniowca wyizolowanego z gleby w różnych temperaturach (badania własne)

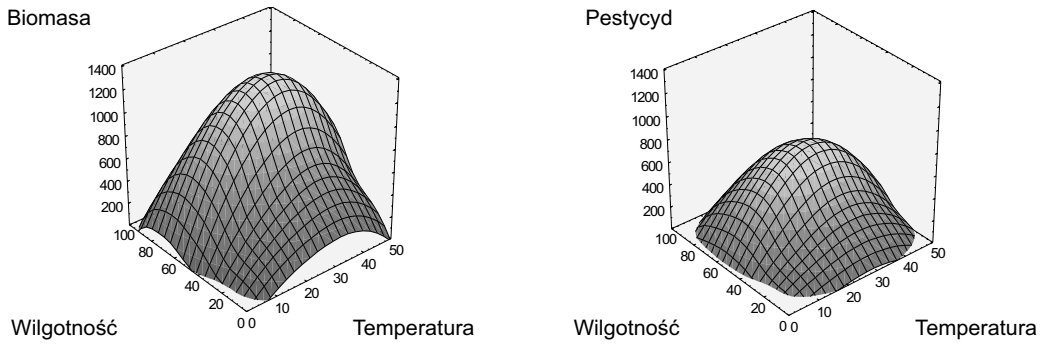


Rys. 15. Ilość biomasy żywych mikroorganizmów w glebie w różnych warunkach temperatury i wilgotności (badania własne)

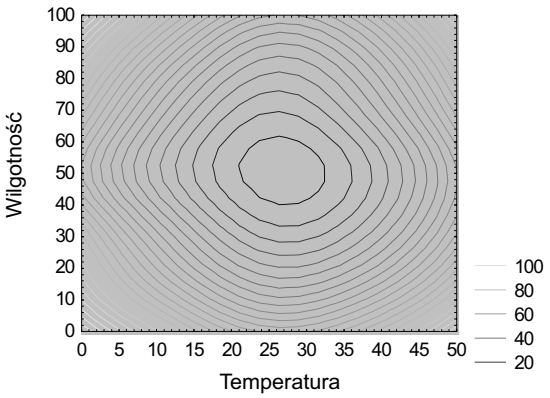
we właściwej dla tego drugiego temperaturze optymalnej, która może różnić cię od temperatury optymalnej pierwszego szczepu (Rys. 14). Paradoksalnie więc – dopiero zastosowanie różnych temperatur pozwala na właściwe porównanie.

Innym problemem jest stosowanie w warunkach laboratoryjnych stałej temperatury. Wpływ pestycydu może różnić się istotnie w temperaturze stałej i zmiennej, jaka panuje w warunkach naturalnych. Tak więc, przenosząc wnioski z badań *in vitro* do warunków *in vivo*, należy takie zjawisko uwzględnić.

W każdej glebie rozwija się charakterystyczna dla niej mikroflora. Jest ona ukształtowana warunkami, jakie w niej panują, jak parametry fizykochemiczne,



Rys. 16. Zmiany charakterystyki ilości biomasy żywych mikroorganizmów w glebie zadanej monolinuronem (badania własne)



Rys. 17. Hamowanie ilości biomasy żywych mikroorganizmów pod wpływem monolinuronu w glebie, w różnych warunkach temoeratury i wilgotności (badania własne)

skład mechaniczny, odczyn, zawartość próchnicy, zasobność w substraty pokarmowe i ich rodzaj, a także wilgotność, temperatura, szata roślinna itp. Wiadomo jednak, że wartości różnych parametrów środowiskowych nie są stałe, lecz podlegają wahaniom, zwłaszcza temperatura i wilgotność gleby ulegają ciągłym zmianom. Mikroorganizmy bardzo szybko reagują na wszelkie zmiany środowiska, stąd wielkość mikroflory w glebie szybko może się zmienić. W warunkach naturalnych rzadko, a jeżeli to przez krótki okres, panują warunki optymalne dla mikroflory. Przeważnie jest za ciepło albo za zimno, za mokro albo za sucho. Stąd ilość biomasy mikroorganizmów dostosowuje się do aktualnych warunków. Dla każdej gleby można ustalić charakterystykę zmian ilości biomasy określającą jej zawartość w zależności od temperatury i wilgotności gleby i wyrazić ją odpowiednim równaniem [2] (Rys. 15).

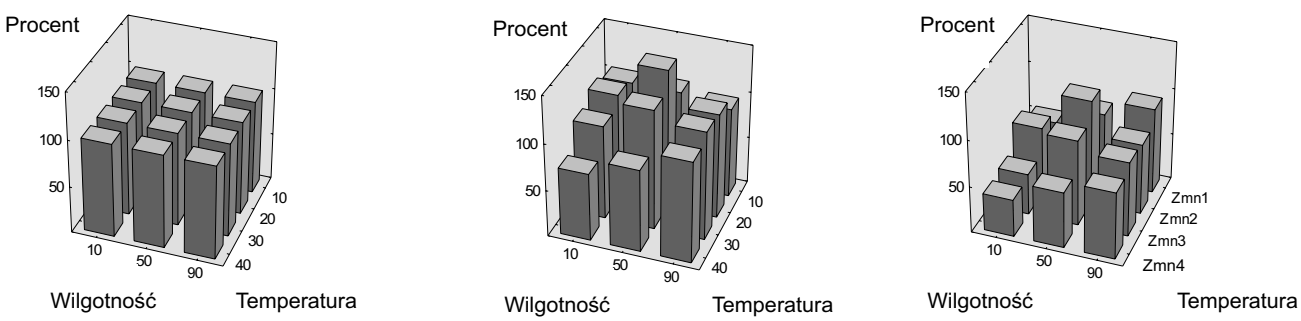
Wprowadzenie pestycydu jest jeszcze jednym, dodatkowym czynnikiem wpływającym na mikroflorę. Jeżeli preparat ma działanie toksyczne, ilość biomasy mikroorganizmów będzie w każdych warunkach obniżona w stosunku do możliwej w tych warunkach ilości w glebie bez pestycydu (Rys. 16). I tu również można wykonać charakterystykę zmian ilości biomasy w glebie z pestycydem w różnych warunkach temperatury i wilgotności a następnie ustalić, jakie obniżenie ilości biomasy powoduje pestycyd przy dowolnych wartościach tych parametrów [2] (Rys. 17, 18).

5. Podsumowanie

Wszystkie przedstawione rozważania wskazują, że pomimo prowadzenia badań nad wpływem pestycydów na mikroflorę gleby od dziesiątków lat, ciągle brak jednego, uznanego standardowego testu, określającego precyzyjnie wpływ tych preparatów na mikroorganizmy. Wytworzył się raczej zestaw typowych badań i oznaczeń, a jego skład wynika częściowo z powodów merytorycznych – znaczenia badanego zjawiska a częściowo ze względów praktycznych. Niewątpliwie bowiem, prościej jest zakopać do gleby kartoniki celulozowe i określić różnicę ich wagi przed i po inkubacji, niż mozolnie analizować zmiany liczebności i zestawu gatunków celulolitycznych.

Prowadzone badania dostarczyły dotychczas już bardzo wielu danych, niestety często sprzecznych, co jest wynikiem nie tylko wpływu rodzaju gleby i parametrów środowiska, ale w znacznej mierze koncepcji założonego doświadczenia, sposobu pomiaru i zestawu wykonywanych oznaczeń. Świadectwem niedostatków stosowanych sposobów oceny wpływu pestycydów na mikroflorę jest poszukiwanie ciągle nowych metod. Czy jednak możliwe jest opracowanie idealnego, w pełni poprawnego testu? Wydaje się, że nie jest to możliwe. Można natomiast ocenić zmiany zachodzące pod wpływem pestycydów stosując kilka różnych badań, i to jeszcze dobranych w sposób odpowiedni do pytania, jakie sobie stawiamy. Za mało zapytać „jak działa pestycyd na mikroflorę?". Trzeba pytać np. „Jak pestycyd zmienia przemiany azotu w glebie?" albo „Jakie zdolności metaboliczne mikroflory pestycyd stymuluje a jakie hamuje?".

Czy taka konkluzja świadczy o niepowodzeniu po latach badań? Ale czy inne metody mikrobiologii gleby



Rys. 18. Zmniejszenie ilości biomasy żywych mikroorganizmów w glebie pod wpływem różnych dawek Monolinuronu (badania własne)

nie sprawiają podobnych kłopotów? Podobne problemy spotyka się przy określaniu zmian w mikroflorze pod wpływem metali ciężkich, substancji ropopochodnych i innych skażeń. Co więcej, czy np. istnieje uniwersalna, niezawodna, dokładna, powtarzalna i precyzyjna metoda określania liczebności drobnoustrojów w glebie? Pomimo tego, jednak nastąpił znaczny postęp w mikrobiologii gleby a nasza wiedza o roli i zachowaniu drobnoustrojów w tym środowisku jest coraz obszerniejsza, podobnie jak ma to miejsce w badaniach nad określaniem wpływu pestycydów na środowisko glebowe.

Piśmiennictwo

1. Domsch K.H., Jagnow G., Anderson T.H.: An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. *Res. Rev.* **86**, 65–105 (1983)
2. Nowak A.: Ein mathematisches Modell zum Einfluss von Monolinuron auf die mikrobielle Biomasse des Bodens. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sh.* **10**, 203–210 (1984)
3. Nowak A.: Wpływ insektycydów IPO-1391, IPO-1401 i chlorfenwinfosu, zastosowanych w postaci substancji aktywnych oraz preparatów na oddychanie mikroflory glebowej. *ORGANIKA-Prace Nauk. Inst. Przem. Org.* 79–86 (1981/82)
4. Nowak A.: Wpływ intensywnego systemu zabiegów chemicznych, stosowanych w uprawie pszenicy ozimej, na niektóre właściwości biochemiczne gleby. Rozprawy AR, **86**, Szczecin, 1982
5. Nowak A., Hurle K:., Beurteilung der Wirkung von Pestiziden und Pestizidkombinationen auf die Bodenmikroflora mit Hilfe von Bodenatmungsmessungen. *Z. PflKrankh. PflSchutz*, *Sh.* **10**, 211–217 (1984)
6. Nowak A., Michalcewicz W.: Susceptibility of Growth and Amylolytic Activity of Some Soil Actinomycetes on Patoran in Different Temperature Conditions. *Zbl. Mikrobiol.* **143**, 457–464 (1988)
7. Nowak A., Michalcewicz W..: Untersuchungen zur Wirkung von Afalon und Gramoxone auf die mikrobielle Biomasse im Boden in Abhangigkeit von Temperatur und Feuchtigkeit. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh.* **13**, 387–395 (1992)
8. Nowak A., Michalcewicz W.: An Attempt to Use LD_{50} to Evaluate Effects of Herbicides on Soil Microflora. *Acta Microbiol. Pol.* **44**, 277–283 (1995)
9. Nowak A., Zbieć I., Gawińska H., Hrebień T.: Wpływ niektórych herbicydów pirydynowych na liczebność drobnoustrojów oraz zawartość biomasy żywych mikroorganizmów w glebie. *Fol. Univ. Agric. Stetin. 201 Agricultura*, **78**, 243–252 (1999)
10. Nowak A., Nowak J., Telesiński A., Przybulewska K., Błaszak M., Kłódka D.: Einfluss von Azoprim 50 WP und Isoturon 500 SC auf die Energielladung und die Zusammensetzung der Mikroflora im Boden. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sh.* **20**, 977–986, (2006).
11. Nowak A., Nowak J., A. Telesiński, K. Przybulewska, M. Błaszak, D. Kłódka: Einfluss von Azoprim 50 WP und Isoturon 500 SC auf die Energielladung und die Zusammensetzung der Mikroflora im Boden. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sh.* **20**, 977–986 (2006)
12. Nowak A., Nowak J., Kłódka D., Przybulewska K., Telesiński A., Jaworska A.: Zusammenhang zwischen ATP Gehalt, Dehydrogenaseaktivität und mikrobieller Biomasse im Boden behandelt mit Herbiziden. *Z. PflKrankh. PflSchutz*, *Sh.* **18**, 1083–1091 (2002)
13. Nowak A., Nowak J., Kłódka D., Przybulewska K., Telesiński A., Szopa E.: Veränderungen der Mikroflora und der biologischen aktivität des Bodens während des Abbaus von Isoproturon. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sh.* **19**, 1003–1016 (2004)
14. Nowak J., Nowak A., Kłódka D., Turos-Biernacka M.: Einfluß der gemeinsamen und getrennten Applikation von Herbiziden und Zusatzstoffen auf die Aktivität von Dehydrogenase und Phosphatase im Boden. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sh.* **17**, 769–774 (2000)
15. Przybulewska K., A. Nowak: Wpływ różnych systemów ochrony chemicznej stosowanych w uprawie ziemniaka na przemiany związków azotowych w glebie. *Chemia i Inżynieria Ekologiczna*, **10**, S2, 219–231 (2003)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 235–240
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROBIOLOGICZNE BEZPIECZEŃSTWO LEKÓW – HARMONIZACJA WYMAGAŃ FARMAKOPEALNYCH

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Stefan Tyski

Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, tel. (22) 851 52 15
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa, e-mail: tyski@il.waw.pl

1. Wprowadzenie. 2. Mikrobiologiczne bezpieczeństwo leków. 3. Harmonizacja farmakopealnych monografii mikrobiologicznych. 3.1. Badanie czystości mikrobiologicznej produktów nie jałowych (całkowita liczba zdolnych do życia drobnoustrojów tlenowych). 3.2. Badanie czystości mikrobiologicznej produktów nie jałowych (badanie obecności określonych drobnoustrojów). 3.3. Mikrobiologiczna jakość preparatów farmaceutycznych. 4. Podsumowanie

Microbiological safety of medicinal products – harmonization of pharmacopoeial requirements

Abstract: Microbiological quality of medicinal products on the market is essential for patients' safety. Several infections connected with bioburden contamination of drugs as well as medical devices have been reported, creating serious health hazard problem. The introduction of procedures of Good Manufacture Practice improved the situation. The harmonization of Ph. Eur. JP and USP monographs connected with microbiological examination of non-sterile products has been recently implemented. Several important changes in test methods and requirements were introduced, which sometimes makes it necessary to change manufacturer's procedures, because harmonized procedures are to be effective from January 1, 2009.

Harmonization process should lead not only to the simplification of the quality control of medicinal products in many countries of the world, but also increase the therapeutic safety of patients.

1. Introduction. 2. Microbiological safety of medicinal products. 3. Harmonization of microbiological pharmacopoeial monographs. 3.1. Microbiological examination of non-sterile products (total viable aerobic count). 3.2. Microbiological examination of non-sterile products (test for specific microorganisms). 3.3. Microbiological quality of pharmaceutical preparations. 4. Summary

Słowa kluczowe: skażenie mikrobiologiczne leków, harmonizacja farmakopei, mikrobiologiczne badanie leków, jakość produktów leczniczych
Key words: microbiological contamination of drugs, pharmacopoeial harmonization, microbiological examination of drugs, quality of medicinal products

1. Wprowadzenie

Jakość mikrobiologiczna produktów leczniczych i wyrobów medycznych znajdujących się w obrocie ma istotne znaczenie dla zdrowia chorych przyjmujących leki i używających rozmaitych wyrobów medycznych. Zawartość odpowiedniej substancji czynnej w deklarowanej dawce i skład leku zgodny ze specyfikacją, powinny gwarantować bezpieczeństwo chorych. Leki stosowane parenteralnie, do oczu, na rozległe rany i oparzenia muszą być jałowe, podobnie jak wyroby medyczne stosowane w inwazyjnych zabiegach diagnostycznych i leczniczych np. igły, cewniki, linie naczyniowe oraz implanty. Druga grupa, to preparaty o określonej czystości mikrobiologicznej, różnej w zależności od drogi podania oraz wyroby medyczne niepowodujące uszkodzenia ciągłości skóry np. kaczki, baseny, termometry. Dopuszczalna jest tu obecność pewnych drobnoustrojów.

Jakość produktów leczniczych i surowców stosowanych w produkcji leków, a także metody analityczne stosowane w badaniach jakości chemicznej i mikrobiologicznej leków opisane są w opracowaniach farmakopealnych. W związku z przystąpieniem Polski pod koniec 2006 r. do Konwencji o Opracowaniu Farmakopei Europejskiej, w naszym kraju obowiązuje Farmakopea Europejska, która obecnie jest tłumaczona na język polski i publikowana jako Farmakopea Polska.

2. Mikrobiologiczne bezpieczeństwo leków

Wytwórcy produktów leczniczych i wyrobów medycznych muszą mieć świadomość, że ich produkty stosowane są nie przez zdrowe, młode, silne osoby, lecz przez chorych, często z ciężką chorobą podstawową (np. AIDS, cukrzyca, choroba nowotworowa) i towarzyszącą upośledzoną odpornością. W związku z tym, jakość mikrobiologiczna produktów odgrywa bardzo istotną rolę dla bezpieczeństwa stosujących je osób. Należy więc zagwarantować, że leki nie są zanieczyszczone drobnoustrojami chorobotwórczymi, ich metabolitami (np. enzymami, toksynami), a także fragmentami komórek (endotoksyna), mogącymi spowodować pogorszenie się stanu chorego lub nawet jego śmierć.

Opisano cały szereg przypadków, tzw. zakażeń odlekowych, a pierwszy cytowany w piśmiennictwie miał miejsce w 1907 roku i dotyczył zanieczyszczenia laseczkami tężca szczepionki przeciwko dżumie [2, 5, 6]. Zakażenia odlekowe przede wszystkim mają charakter sporadyczny, jednakże w 1972 roku w jednym ze szwedzkich szpitali klinicznych opisano epidemię duru brzusznego (obejmującą ponad 200 osób) po podaniu chorym leku doustnego zawierającego surowiec – gruczoły tarczycy, skażony pałeczkami *Salmonella*. Był to klasyczny przykład odlekowego zakażenia szpitalnego. Podobny charakter miały przypadki posocznicy u dzieci w Wielkiej Brytanii po podaniu roztworów do odżywiania pozajelitowego skażonych *Pseudomonas aeruginosa* [1, 2]. Zakażenia obejmujące liczne przypadki chorych, wywoływane były nie tylko przez chorobotwórcze drobnoustroje obecne w leku – np. w Afryce zachodniej opisano zakażenia *Vibrio cholerae* po popiciu leków doustnych wodą skażoną przecinkowcami.

W związku z wprowadzaniem zasad Dobrej Praktyki Wytwarzania (GMP) produktów leczniczych i upowszechnianiem procesu akredytacji wytwórców farmaceutycznych, liczba nieprawidłowych serii produktów nie jałowych lub zawierających dużą liczbę drobnoustrojów w tym także chorobotwórczych ciągle się zmniejsza [7, 10, 11]. Poprawie ulega higiena nie tylko w zakładach wytwarzających leki, lecz również w jednostkach służby zdrowia. Ciągle jednak zdarzają się wśród chorych przypadki zakażeń bakteryjnych i wirusowych (np. WZW, HIV) związanych z nieprawidłową aseptyką podczas wykonywania iniekcji oraz nieprawidłową dezynfekcją przedmiotów i pomieszczeń. Ponadto, przeszczepiane tkanki, narządy oraz podawane preparaty krwiopochodne również mogą niekiedy stanowić źródło zakażeń (bakteryjnych, wirusowych oraz prionowych).

Nie wszyscy zdają sobie sprawę, że działania niepożądane, w tym nawet wstrząs toksyczny, mogą wystąpić u chorych po podaniu leków parenteralnych, jałowych, lecz zawierających endotoksyny bakteryjne. Nieprawidłowy proces produkcyjny leku, sprzyjający namnażaniu pałeczek Gram-ujemnych w produktach pośrednich, ale kończący się skuteczną sterylizacją produktu finalnego, może doprowadzić do powyższej sytuacji.

Osobnym problemem niektórych szpitali były zakażenia wywołane drobnoustrojami bytującymi i namnażającymi się w preparatach dezynfekcyjnych (zaliczanych obecnie do grupy produktów biobójczych), zwłaszcza tych zawierających czwartorzędowe związki amoniowe [1, 2, 5, 7].

Z kolei pewne zakażenia, w tym oportunistyczne, mogą być konsekwencją stosowanej terapii. Leki obniżające odporność naturalną człowieka, takie jak cytostatyki, preparaty steroidowe inne preparaty immunosupresyjne, stosowane zwłaszcza w leczeniu chorób nowotworowych oraz podczas przeszczepów mogą przyczyniać się pośrednio do wzrostu podatności chorego na zakażenia zwłaszcza bakteryjne i grzybicze.

Często, nieprawidłowo prowadzona antybiotykoterapia oraz chemioterapia przeciwdrobnoustrojowa prowadzi do narastania oporności mikroorganizmów na leki a częste, długotrwałe stosowanie antybiotyków sprzyja pojawieniu się i rozwojowi zakażeń grzybiczych.

Powyższe zagadnienia są ściśle powiązane z mikrobiologicznym bezpieczeństwem stosowanych leków.

Istotnym problemem klinicznym związanym z obecnością drobnoustrojów w leku mogą być nie tylko zakażenia odlekowe, lecz również utrata właściwości terapeutycznych produktów leczniczych podawanych chorym. Może to być związane z przemianą lub rozkładem substancji leczniczych wskutek działania drobnoustrojów – np. inaktywacja penicylin pod wpływem β-laktamaz bakteryjnych, hydroliza aspiryny w zawiesinie przez esterazy bakteryjne, rozkład atropiny (krople do oczu) lub steroidów (maści, kremy) pod wpływem grzybów. Problem może dotyczyć rozkładu substancji konserwujących (opisano takie przypadki spowodowane przez szczepy *Pseudomonas* spp.), a następnie procesu namnażania drobnoustrojów w leku [1, 2, 6, 7].

Zmiany organoleptyczne leków spowodowane przez drobnoustroje (jak np. pogorszenie wyglądu i smaku w przypadku syropów, zmiana barwy, plamy – tabletki), a także niszczenie preparatów (np. rozpad tabletek, skawalanie się proszków i granulatów) wpływają nie tylko na bezpieczeństwo pacjentów, lecz mają także duże znaczenie ekonomiczne dla wytwórcy. Niedopuszczenie zanieczyszczonej mikrobiologicznie lub zmienionej fizycznie serii produktu do obrotu albo konieczność wycofania serii leku z rynku, w sposób istotny zwiększa koszt wytwarzania produktów leczniczych.

Jednym z głównych zadań mikrobiologii farmaceutycznej jest określanie jakości mikrobiologicznej produktów leczniczych. Jednakże problem związany z realizacją tego celu w przemyśle farmaceutycznym jest ogólny i obejmuje kontrole: środowiska wytwarzania produktów leczniczych, procesu produkcyjnego (czystość mikrobiologiczną powietrza, powierzchni i personelu), a także jakości surowców, produktów pośrednich i produktu końcowego [6–9]. Kluczowe znaczenie odgrywa jakość mikrobiologiczna naturalnych surowców farmaceutycznych – roślinnych, zwierzęcych i mineralnych. Leki ziołowe są obecnie grupą produktów stanowiących największy problem mikrobiologiczny.

3. Harmonizacja farmakopealnych monografii mikrobiologicznych

W grudniu ubiegłego roku opublikowano Suplement 2007 Farmakopei Polskiej VII [3, 4], w którym m.in. sygnalizowane są duże zmiany w badaniach mikrobiologicznych produktów leczniczych niejałowych

oraz nowe kategorie podziału tych produktów. Zmiany te wynikają z postępującego procesu harmonizacji Farmakopei Europejskiej (Ph. Eur.) z Farmakopeą Japońską (JP) i z Farmakopeą Stanów Zjednoczonych (USP). Działania te są prowadzone w uzgodnieniu z Międzynarodową Konferencją Harmonizacji (ICH), a ich celem jest opracowywanie ujednoliconych monografii i tekstów podstawowych. Harmonizacja daje korzyści w postaci uproszczenia i racjonalizacji metod kontroli jakości oraz procedur dopuszczania produktów leczniczych do obrotu. Harmonizacja przyczynia się również do zmniejszeniem liczby badań kontrolnych i tym samym obniżenia kosztów. Komisje trzech farmakopei zobowiązały się, że nie będą wprowadzać jednostronnych zmian do zharmonizowanych monografii i tekstów podstawowych, ale będą stosowały uzgodnioną procedurę nowelizacji zgodnie, z którą wszystkie jednostki będą wprowadzały takie zmiany jednocześnie. Harmonizacja jest procesem bardzo złożonym. Biorąc pod uwagę różne obszary geograficzne, gdzie obowiązują dane opracowania farmakopealne: Europę, Stany Zjednoczone i Japonię, w trakcie ujednolicania tekstów pojawiają się problemy wynikające m.in. z rozmaitej drogi rozwoju przemysłu farmaceutycznego i procesów wytwórczych. Ponadto ujednolicenia wymagają zróżnicowania wypływające z odmiennej tradycji oraz różnego rozwoju naukowego tych obszarów. Każdy region ma doświadczenie w wykonaniu badań swoimi metodami i przeświadczenie o prawidłowości otrzymywanych wyników. Prawie wszystkie kraje Europy podpisały już Konwencję o Opracowaniu Farmakopei Europejskiej, jednakże w wielu z nich opracowywane są farmakopee narodowe, obejmujące istotne dla danego kraju własne monografie.

Bardzo ważne w trakcie harmonizacji jest poszukiwanie wyboru i kompromisu, co prowadzi do ograniczenia liczby metod badania różnych kategorii produktów leczniczych, a także konieczności rewalidacji nowych metod. Niekiedy łączy się to z wprowadzeniem nowych grup badań do procesu wytwórczego. Proces harmonizacji dodatkowo utrudniony jest ze względu na różne przepisy prawne obowiązujące w Europie, Stanach Zjednoczonych i Japonii, a także na odmienność języka japońskiego i angielskiego – wspólnego dla USP i Ph. Eur.

W obrębie obszaru mikrobiologicznego, do tej pory zharmonizowano monografie dotyczące badań jałowości leków, endotoksyn bakteryjnych oraz skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej leków. W listopadzie 2005 r. Grupa Dyskusyjna Farmakopei uzgodniła, że nastąpi harmonizacja monografii: „Badanie czystości mikrobiologicznej produktów niejałowych (całkowita liczba zdolnych do życia drobnoustrojów tlenowych)", „Badanie czystości mikrobiologicznej produktów niejałowych (badanie obecności określonych drobnoustrojów)" oraz „Mikrobiologiczna jakość preparatów farmaceutycznych". Do końca 2008 r. w ramach okresu przejściowego, obowiązują równolegle oba wymagania – dotychczasowe i zharmonizowane. Natomiast od 01.01.2009 obowiązywać będą już tylko wymagania zharmonizowane. W obecnym tekście podstawowym monografii [4] zamieszczono akapit, w którym wyjaśniono, że aktualnie są dopuszczone do stosowania 2 grupy metod – pierwsza przedstawia dotychczasowe metody porównawcze do ustalenia zgodności z monografiami. Odwołanie się w monografii do tego rozdziału oznacza zastosowanie pierwszej grupy badań, dopóki nie zostanie zatwierdzone stosowanie drugiej grupy badań. Natomiast badania wykonane metodami z drugiej grupy (obejmującej badania zharmonizowane, opracowane we współpracy Ph. Eur., JP i USP) również stanowią oficjalne badania zgodne z farmakopeą i można się do nich odwoływać, szczególnie w nowych wnioskach o pozwolenie na dopuszczenie leków do obrotu.

Harmonizacja objęła swoim zakresem również zmianę kategorii produktów leczniczych niejałowych i kryteriów ich akceptacji. W obowiązującym tekście podstawowym przedstawiono 2 grupy zalecanych kryteriów akceptacji jakości mikrobiologicznej. Do końca 2008 r. pierwsza grupa kryteriów podana w tym rozdziale zostanie zastąpiona przez grupę drugą. Poniżej przedstawiono najbardziej istotne zmiany w omawianych monografiach.

3.1. Badanie czystości mikrobiologicznej produktów nie jałowych (całkowita liczba zdolnych do życia drobnoustrojów tlenowych)

Zamiast oznaczeń literowych podłoży wprowadzono pełne ich nazwy zwyczajowe, które są powszechnie znane osobom pracującym w mikrobiologii. Wprowadzono jednoznaczne sformułowania stwierdzające, że opisanych metod nie stosuje się do produktów zawierających jako składniki czynne, zdolne do życia drobnoustroje oraz, że alternatywne procedury mikrobiologiczne, włącznie z metodami zautomatyzowanymi mogą być stosowane pod warunkiem, że zostanie wykazana ich równoważność z metodą farmakopealną.

W tekście zharmonizowanym, w przypadku metody oznaczania najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL), która jest zasadniczo najmniej dokładną metodą do określania liczby drobnoustrojów, przyjęto podejście, że w przypadku niektórych grup produktów z bardzo małym zanieczyszczeniem mikrobiologicznym, NPL może być metodą najbardziej właściwą.

W metodzie zharmonizowanej, podczas badania żyzności podłoży hodowlanych i oceny przydatności

metod liczenia, zamiast szczepu *E. coli* stosuje się *P. aeruginosa.* Dokładnie określono techniki postępowania z tzw. materiałem siewnym. Drobnoustroje używane do zaszczepiania powinny pochodzić z nie wyższego niż 5 pasaż macierzystej serii siewnej. Przygotowaną standaryzowaną zawiesinę drobnoustrojów można stosować w czasie 2 h, lub 24 h – w tym przypadku powinna ona być przechowana w temp. 2–8°C.

Stabilna zawiesina spor *Clostridium sporogenes* może być przechowywana w temp. 2–8°C przez okres potwierdzony w procesie walidacji. Ze względu na duży błąd w wynikach testów mikrobiologicznych zamiast pojęcia „walidacja metody", zasadniczo przyjęto określenie „przydatność metody do określonego celu". Taka przydatność metody musi być potwierdzona, jeżeli wprowadzi się zmianę w metodyce badania lub w produkcie, mogącą wpływać na wynik badania.

Bardzo ważną sprawą, jednocześnie komplikującą pracę, jest konieczność badania żyzności każdej serii gotowego podłoża i każdej serii podłoża przygotowanego z odwodnionego materiału lub z podanych składników. Poprzednio, można było oprzeć się na certyfikatach wytwórcy podłoży, który badał u siebie żyzność podłoża danej serii. Według zapisu zharmonizowanego badanie żyzności należy wykonać w laboratorium kontrolującym jakość produktów leczniczych. Zmniejszono nieco liczbę komórek drobnoustrojów w inokulum stosowanym do zaszczepiania porcji bulionu z hydrolizatem kazeiny i soi oraz płytek agaru z hydrolizatem kazeiny i soi (obecnie – nie więcej niż 100 komórek).

Istotną sprawą przy interpretacji otrzymanych wyników jest współczynnik 2 (uprzednio był współczynnik 5) określający, że uzyskany wzrost drobnoustrojów może być, co najwyżej 2 razy mniejszy/większy od obliczonej wartości dla standaryzowanego inokulum. Również podczas weryfikacji przydatności metody z użyciem sączków membranowych lub metody posiewu bezpośredniego, średni wynik liczenia każdego drobnoustroju testowego może być, co najwyżej 2 razy mniejszy/większy od wartości otrzymanej dla kontroli bez produktu.

Przyjęto następujące kryterium akceptacji dla liczebności drobnoustrojów: gdy kryterium jest 10 CFU, to maksymalna dopuszczalna liczba koloni = 20; gdy 10^2 CFU, to maksymalnie dopuszcza się 200 CFU, a gdy 10^3 CFU, maksymalna dopuszczalna liczba to 2000 kolonii.

W tekście zharmonizowanym wprowadzono nową kategorię produktów leczniczych – płyny lub formy stałe w postaci aerozolu. Ponadto zachowano dawne kategorie, takie jak: produkty rozpuszczalne w wodzie, produkty niezawierające tłuszczów, nierozpuszczalne w wodzie, produkty zawierające tłuszcze, systemy transdermalne.

W celu zneutralizowania aktywności przeciwdrobnoustrojowej produktu, należy zastosować odpowiednią metodę neutralizacji.

W metodzie zharmonizowanej określono sytuacje, kiedy można prowadzić badania na zmniejszonej ilości produktu, zamiast zazwyczaj przyjętej ilości, tzn. 10 g lub 10 ml produktu, 10 opakowań aerozoli, 10 systemów transdermalnych.

W przypadku produktów, gdzie ogólna liczba jednostek w serii jest mniejsza niż 200 (np. próbki używane w badaniach klinicznych), wielkość próbki może być zmniejszona do 2 jednostek lub nawet 1 jednostki, jeżeli wielkość serii jest mniejsza niż 100. Dla materiałów stosowanych jako substancje czynne, gdzie ilość próbki jest ograniczona lub wielkość serii jest niezwykle mała (mniej niż 1000 ml lub 1000 g), można badać tylko 1% serii o ile mniejsza ilość nie jest podana lub uzasadniona i zatwierdzona.

Wprowadzone zmiany harmonizacyjne dotyczą również bardzo istotnej sprawy – przyjęcia nowego podejścia w liczeniu komórek bakterii i grzybów. Pojęcie: ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych (TAMC – total aerobic microbial count) oznacza liczbę kolonii, które wyrosły na podłożu agarowym z hydrolizatem kazeiny i soi, przy czym jeżeli kolonie grzybów są wykrywane na tym podłożu, zaliczane są do części TAMC. Zasadniczo jednak na podłożu tym rosną kolonie bakterii, stąd liczba TAMC świadczy o liczbie komórek bakteryjnych. Jeżeli liczba drobnoustrojów jest określana metodą najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL), otrzymany wynik odpowiada liczbie TAMC.

Pojęcie: ogólna, łączna liczba drożdży i pleśni (TYMC – total yeast/moulds count) oznacza liczbę kolonii równą liczbie kolonii, które wyrosły na podłożu agarowym Sabouraud z dekstrozą. Jeżeli kolonie bakterii są wykrywane na tym podłożu, zaliczane są do części TYMC. W pewnych sytuacjach, gdy można spodziewać się, że wartość TYMC przekroczy przyjęte kryterium akceptacji w związku ze wzrostem bakterii, można użyć podłoże agarowe Sabouraud z dekstrozą zawierające antybiotyki (nie określono jednak jakie antybiotyki i w jakim stężeniu można je stosować). Zharmonizowane podejście do powyższego zagadnienia jest nieco odmienne od dotychczasowego – czysto mikrobiologicznego, gdzie zwracano uwagę, czy jest to kolonia bakterii czy grzybów. Teraz analiza sprowadza się do policzenia kolonii i domniemania, że na podłożu agarowym z hydrolizatem kazeiny i soi wyrosły tylko kolonie bakteryjne, a na podłożu agarowym Sabouraud tylko kolonie grzybów. Zgodnie z obecnie przyjętymi pojęciami, ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych to nie suma liczb kolonii bakterii i kolonii grzybów, ale liczba równa tylko liczbie kolonii bakterii.

3.2. Badanie czystości mikrobiologicznej produktów nie jałowych (badanie obecności określonych drobnoustrojów)

W metodzie zharmonizowanej mogą być stosowane alternatywne procedury mikrobiologiczne, włącznie z metodami zautomatyzowanymi pod warunkiem, że zostanie wykazana ich równoważność z metodą farmakopealną. W nowych procedurach ogólnych odwołano się do zapisów dotyczących przygotowania próbek, neutralizacji aktywności przeciwdrobnoustrojowej i stosowania odpowiednich związków powierzchniowo czynnych. W metodzie zharmonizowanej szczegółowo omówiono sposób przygotowywania szczepów testowych, do których włączono *C. albicans*, a także wprowadzono pewne zmiany w samej procedurze badania żyzności. Podkreślono także konieczność wykonania kontroli ujemnej podczas weryfikacji warunków badania żyzności i określenia przydatności badania do wykrywania drobnoustrojów w obecności produktu badanego.

Analogicznie do wcześniejszego rozdziału, przyjęto zapis o konieczności badania każdej serii gotowego podłoża i każdej serii podłoża przygotowanego z odwodnionego materiału lub ze składników. Ponadto zwrócono uwagę na standaryzację zawiesin szczepów testowych i stosowanie drobnoustrojów używanych do zaszczepiania podłoży, maksymalnie z 5 pasażu macierzystej serii siewnej. Do zestawu drobnoustrojów testowych dołączono szczep *C. albicans*, który należy hodować na podłożu agarowym Sabouraud z dekstrozą lub w bulionie Sabouraud z dekstrozą w temp. 20–25°C przez 2–3 dni. Podkreślono, że należy stosować zawiesinę drobnoustrojów w czasie 2 h lub 24 h – w tym przypadku powinna być przechowana w temp. 2–8°C. Zawiesina spor *C. sporogenes* może być przechowywana w temp. 2–8°C ale przez okres potwierdzony w procesie walidacji – nie określono ogólnego czasu przechowywania.

W badaniu żyzności podłoży zwrócono uwagę, aby zaszczepiać je małą liczbą komórek, to jest stosując nie więcej niż 100 komórek odpowiedniego drobnoustroju. Ważną sprawą jest, aby podczas oceny żyzności podłoży, próby inkubować w określonej temperaturze nie dłużej niż przez najkrótszy czas określony w badaniu. Natomiast podczas oceny właściwości wybiórczych podłoży, próby należy inkubować w określonej temperaturze nie krócej niż przez najdłuższy czas określony w badaniu. W tym wypadku nie powinien wystąpić wzrost drobnoustrojów testowych. Z kolei w przypadku oceny właściwości identyfikacyjnych podłoży, inkubacja szczepów testowych powinna przebiegać w pełnym zakresie czasu podanym w badaniu, a więc w najkrótszym i najdłuższym. W ramach badań porównawczych serii podłoży, wygląd i badania identyfikacyjne otrzymanych kolonii są podobne i wskazują na cechy kolonii uzyskanych wcześniej na uprzednio badanej i zatwierdzonej serii podłoża.

Każda aktywność przeciwdrobnoustrojowa produktu wymusza potrzebę modyfikacji procedury badania. Jeżeli w przypadku danego produktu aktywność ta w odniesieniu do drobnoustroju, który ma zostać użyty w badaniu nie może być zneutralizowana przyjmuje się, że hamowany drobnoustrój nie będzie obecny w produkcie.

W tekście zharmonizowanym zmieniono również, w stosunku do FP VII, część warunków dotyczących prowadzenia hodowli drobnoustrojów.

3.3. Mikrobiologiczna jakość preparatów farmaceutycznych

Produkty lecznicze niejałowe mogą zawierać określoną liczbę drobnoustrojów i nie powinny zawierać zdefiniowanych bakterii i niekiedy też grzybów. Obecność nadmiernej liczby drobnoustrojów i wydzielanych przez nie enzymów, a także obecność wykluczanych bakterii może powodować zniszczenie postaci leku, może także prowadzić do obniżenia lub nawet zniesienia leczniczego działania preparatu. W związku z tym, wytwórcy preparatów leczniczych powinni zapewnić jak najmniejsze zanieczyszczenie mikrobiologiczne produktu leczniczego poprzez wprowadzanie aktualnych wytycznych Dobrej Praktyki Wytwarzania.

Mikrobiologiczne badania preparatów niejałowych powinny być prowadzone zgodnie z metodami podanymi w odpowiednich rozdziałach Suplementu 2007 FP VII [4]. W tekście zharmonizowanym kryteria akceptacji oparte są na ogólnej liczbie drobnoustrojów tlenowych – TAMC i ogólnej liczbie pleśni i drożdży – TYMC, a także na wykluczeniu określonych bakterii i grzybów. Przedstawiona lista kryteriów nie jest ostateczna i dla określonych preparatów może być niezbędne badanie innych drobnoustrojów w zależności od rodzaju materiałów wyjściowych i procesu wytwarzania.

W przypadku, gdy żadna z podanych metod badania nie pozwala na wiarygodne określenie liczby drobnoustrojów na podanym poziomie, używa się zwalidowanej metody z granicą wykrywalności bliską, jak to tylko możliwe, wskazanemu kryterium akceptacji. Ponadto, oceniane jest znaczenie innych drobnoustrojów w zależności od: drogi i sposobu podania preparatu; jego zdolności do podtrzymywania wzrostu drobnoustrojów; poziomu ochrony przeciwdrobnoustrojowej; ryzyka dla pacjentów należących do różnych grup (np. noworodków, osób z upośledzoną

odpornością, osób w podeszłym wieku); stosowania dodatkowego leczenia (np. immunosupresyjnego, przeciwzapalnego) oraz występowania dodatkowych chorób, ran, uszkodzeń narządów.

Bardzo istotną sprawą jest wprowadzenie kryterium czystości mikrobiologicznej dla wszystkich substancji stosowanych w procesie wytwarzania produktów leczniczych – substancji czynnych oraz pomocniczych. Przyjmuje się, że jeżeli czystość mikrobiologiczna dla danej substancji nie jest określona w monografii szczegółowej, to powinna odpowiadać następującemu kryterium: TAMC – 10^3 cfu/g lub cfu/ml, TYMC – 10^2 cfu/g lub cfu/ml.

4. Podsumowanie

Sygnalizowane powyżej wprowadzane zmiany w badaniach mikrobiologicznych i kryteriach akceptacji dla nie jałowych produktów leczniczych, w pewnym sensie wymuszone procesem harmonizacji, powodują duże zamieszanie w przemyśle farmaceutycznym i zmuszają do podejmowania dodatkowych wysiłków i czynności związanych z walidacją metod, wprowadzaniem zmian w procedurach analitycznych i dokumentacji farmaceutycznej.

Należy jednak mieć nadzieję, że wprowadzane od nowego roku zmiany przyczynią się do poprawy jakości mikrobiologicznej leków i do zmniejszenia liczby zakażeń związanych ze stosowaniem produktów leczniczych. Tym samym wzrośnie bezpieczeństwo chorych przyjmujących leki.

Piśmiennictwo

1. Baird R.M.: Contamination of non-sterile pharmaceuticals in hospital and community environments. (w) Pharmaceutical Microbiology, red. W.B. Hugo, A.D. Russell, Blackwell Publishing, 1998, s. 374–384
2. Bard R.: Microbial spoilage, infection risk and contamination control. (w:) Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology, red. S.P. Denyer, N.A. Hodges, S.P. Gorman, Blackwell Publishing, 2005, s. 263–284
3. Farmakopea Polska VII tom 1, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, 2006
4. Farmakopea Polska VII Suplement 2007, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, 2007
5. Parnowska W.: Mikrobiologiczne skażenie leków – problem kliniczny i produkcyjny. *Postępy Nauk Medycznych*, **10**, 21–31 (1997)
6. Parnowska W.: Wprowadzenie (w:) Mikrobiologia farmaceutyczna. Problemy produkcji i kontroli leków. red. W. Parnowska, Wyd. Lekarskie PZWL, 1998, s. 13–28
7. Tyski S.: Aktualne zagadnienia mikrobiologii farmaceutycznej. *Mikrobiologia Medycyna*, **2**, 10–15 (2001)
8. Tyski S.: Czystość mikrobiologiczna a jakość środków farmaceutycznych. *Farmacja Polska*, **59**, 767–774 (2003)
9. Van Doorne H.: A basic primer on pharmaceutical microbiology. (w) Microbiology in Pharmaceutical Manufacturing, red. R. Prince, PDA Bethesda, MD, USA, Davis Horwood International Publishing, Ltd. Godalming, Surrey, UK, 2001, s. 71–123
10. Zaręba T., Kruszewska H., Tyski S.: Farmakopealne metody badania czystości mikrobiologicznej preparatów farmaceutycznych. *Biuletyn Instytutu Leków*, **44**, 204–205 (2000)
11. Zaręba T., Kruszewska H., Tyski S.: Analiza mikrobiologiczna produktów leczniczych zbadanych w Narodowym Instytucie Leków w latach 1997–2006. XX Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Katowice, 25–28.09.2007 Materiały konferencyjne, 558–559

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 241–247
http://www.pm.microbiology.pl

BIOLOGICZNE WYTWARZANIE WODORU

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Krzysztof W. Szewczyk

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej
ul. Waryńskiego 1, 00-645 Warszawa, tel. (22) 243 64 13, e-mail: szewczyk@ichip.pw.edu.pl

1. Wstęp. 2. Bezpośrednia biofotoliza. 3. Dwustopniowa biofotoliza. 4. Fotofermentacja. 5. Bioelektroliza wody. 6. Biokonwersja tlenku węgla. 7. Fermentacja wodorowa. 8. Podsumowanie

Biological production of hydrogen

Abstract: Hydrogen is a valuable gas as a clean energy carrier and as feedstock for some industries. Biological hydrogen production processes are found to be more environmentally friendly and less energy intensive if compared to thermochemical and electrochemical processes. Biological hydrogen production technologies provide a wide range of approaches to generate hydrogen, including direct biophotolysis, indirect biophotolysis, water – gas shift reaction, biocatalyzed electrolysis, photo-fermentation and dark fermentation. The paper presents a survey of biological hydrogen production processes.

1. Introduction. 2. Direct biophotolysis. 3. Indirect biophotolysis. 4. Photo-fermentation 5. Biocatalyzed electrolysis. 6. Water gas shift reaction. 7. Dark fermentation. 8. Summary

Słowa kluczowe: wodór, ciemna fermentacja, biologiczne wytwarzanie wodoru
Key words: hydrogen, dark fermentation, biological hydrogen production

1. Wstęp

Wodór jest uważany za paliwo XXI wieku. Jego wykorzystanie nie powoduje negatywnych skutków ekologicznych, takich jakie występują w przypadku używania paliw kopalnych. Wodór ma bardzo wysoką wartość opałową na jednostkę masy (143 MJ/kg), jeden kilogram wodoru odpowiada 2,75 kg benzyny [7]. Ma to istotne znaczenie np. w transporcie lotniczym i astronautyce. Wodór jest obecnie wykorzystywany głównie do produkcji amoniaku, przetwarzania ropy naftowej, syntezy metanolu i utwardzania tłuszczów [25]. W przyrodzie wodór nie występuje w czystej postaci. Nie jest zatem pierwotnym źródłem energii tak jak ropa naftowa czy węgiel, ale jej nośnikiem. Do jego wytworzenia potrzebne są odpowiednie technologie. Wodór jest wytwarzany przede wszystkim z ropy naftowej (50%) a także z gazu ziemnego (ok. 30%) i węgla (15%) [21, 27]. Najczęściej stosowaną technologią produkcji wodoru jest reforming węglowodorów z parą wodną:

$$CH_4 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + CO_2 \quad (1)$$

$$C_nH_{2m} + 2nH_2O \rightarrow (m + 2n)H_2 + nCO_2 \quad (2)$$

W przypadku stosowania węgla również otrzymuje się wodór i ditlenek węgla:

$$C + H_2O \rightarrow CO + H_2$$
$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2 \quad (3)$$

Wodór, który jest wytwarzany z paliw kopalnych, nie może być uznany za w pełni ekologiczny nośnik energii. Co prawda spalanie wodoru nie powoduje powstawania gazów cieplarnianych ale podczas jego produkcji powstają duże ilości ditlenku węgla.

Możliwość produkowania wodoru ze źródeł odnawialnych, a zwłaszcza z biomasy, otwiera nowe perspektywy przed tym nośnikiem energii. Biomasa może być wykorzystana do wytwarzania wodoru bądź w procesach termochemicznych (piroliza i gazyfikacja) bądź w procesach mikrobiologicznych. Wytwarzanie wodoru przez mikroorganizmy uniezależnia produkcję od paliw kopalnych i wymaga mniejszych nakładów energii niż metody termochemiczne. Może być także połączone z utylizacją ścieków lub odpadów.

Wiele różnych drobnoustrojów zaliczanych do różnych grup taksonomicznych i fizjologicznych, może produkować wodór. Mikroorganizmy wytwarzają wodór z dwóch zasadniczych powodów: jednym jest utlenienie nadmiaru równoważników redukcyjnych (zredukowanych dinukleotydów), drugim to asymilacja azotu, w której wodór jest produktem ubocznym. Podstawowymi białkami dla produkcji wodoru są hydrogenazy i nitrogenazy [4, 34]. Enzymy te regulują metabolizm wodoru zarówno u prokariota jak i u niektórych organizmów eukariotycznych np. zielonych alg. Procesy biologicznego wytwarzania wodoru można podzielić na dwie główne grupy: procesy z udziałem światła i bez udziału energii świetlnej. Do pierwszej grupy należą: biofotoliza wody i fotofermentacja zaś do drugiej ciemna fermentacja wodorowa, bioelektroliza oraz biokonwersja tlenku węgla. W artykule przedstawiono przegląd możliwości wykorzystania technik mikrobiologicznych do produkcji wodoru i perspektywy ich rozwoju.

2. Bezpośrednia biofotoliza

Mikroalgi i cyjanobakterie mogą w warunkach beztlenowych produkować wodór w wyniku fotolizy wody. Proces ten jest atrakcyjny z uwagi na wykorzystanie powszechnie dostępnego substratu – wody.

$$2H_2O \xrightarrow{\text{energia świetlna}} 2H_2 + O_2 \quad (4)$$

Mechanizm tego procesu przedstawiono na rysunku 1. W wyniku absorpcji energii świetlnej przez fotosystem II (PSII), a następnie fotosystem I (PSI), rozbiciu ulega cząsteczka wody oraz uwalniane są elektrony. Elektrony przenoszone są na ferredoksynę. Hydrogenaza przyjmuje elektrony bezpośrednio od zredukowanej ferredoksyny, w wyniku czego powstaje wodór cząsteczkowy [7, 18]. Hydrogenaza jest hamowana silnie przez tlen. W przypadku cyjanobakterii powstawanie wodoru i tlenu jest przestrzennie rozdzielone. Wodór powstaje w wyniku działania hydrogenazy w heterocystach, co zapewnia ochronę przed dostępem tlenu i działaniem nitrogenazy [7].

Proces jednoczesnego wytwarzania wodoru i tlenu przeprowadzono z powodzeniem tylko w warunkach, gdy zawartość tlenu w powietrzu była niższa niż 0,1%. Osiągnięcie takich warunków do produkcji wodoru na skalę przemysłową jest trudne [1, 4, 7]. Być może w przyszłości, dzięki inżynierii genetycznej będzie można uzyskać mutanty o podwyższonej tolerancji na tlen.

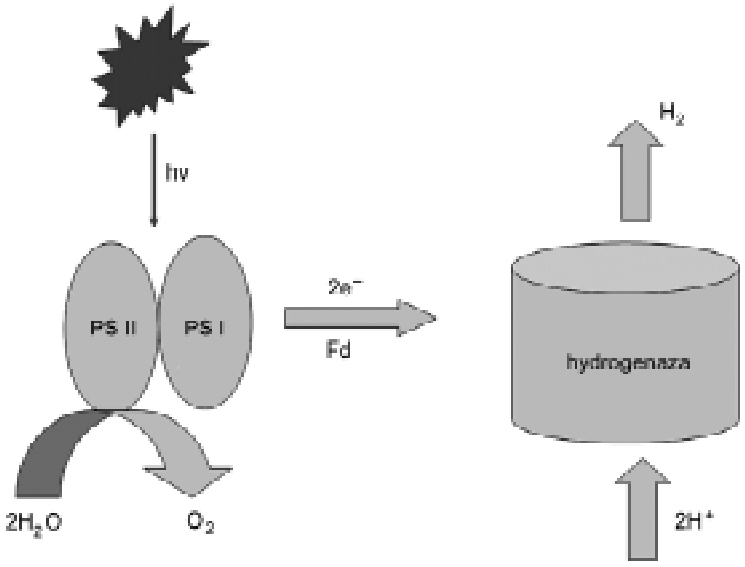
Efektywność autotroficznej fotolizy charakteryzuje się najczęściej za pomocą sprawności fotochemicznej. Jest to ilość energii wytwarzanej w formie wodoru w stosunku do energii świetlnej zużywanej w procesie. Najczęściej sprawność odnosi się do energii promieniowania aktywnego w fotosyntezie: 400–700 nm w przypadku zielonych alg i 400–950 nm dla bakterii purpurowych. W procesach autotroficznej fotolizy sprawność fotochemiczna wynosi od 3% do 10% [1]. Sprawność fotochemiczna jest kluczowym czynnikiem wpływającym na koszty wytwarzania, w tym głównie koszt fotoreaktora.

3. Dwuetapowa biofotoliza

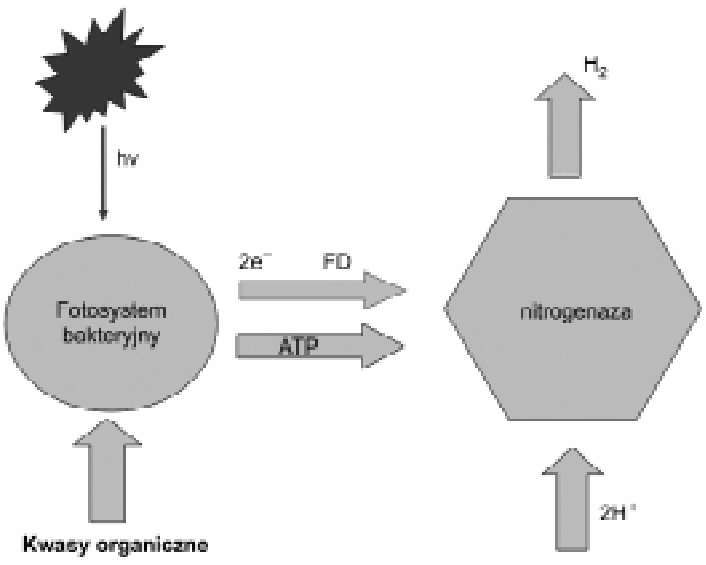
W dwuetapowej biofotolizie (*indirect biophotolysis*) reakcje, w wyniku których powstaje tlen i wodór, są czasowo rozdzielone. W etapie pierwszym następuje rozkład wody i powstaje tlen, podobnie jak w przypadku bezpośredniej biofotolizy. Wytwarzane elektrony są wykorzystywane do asymilacji ditlenku węgla i tworzenia materiałów komórkowych. W etapie drugim następuje rozkład fermentacyjny materiałów komórkowych, zaś elektrony przenoszone są przez ferredoksynę na hydrogenazę i powstaje wodór. W przypadku zielonych alg *Chlamydomonas reinhardtii* uzyskano rozdzielenie asymilacji ditlenku węgla od wytwarzania wodoru dzięki przeniesieniu drobnoustrojów do medium bez siarki [26]. Brak siarki w podłożu powodował odwracalne hamowanie fotosystemu PSII i zatrzymanie wytwarzania tlenu. Jednocześnie aktywny był fotosystem PSI i przenoszenie elektronów poprzez ferredoksynę na hydrogenazę.

4. Fotofermentacja

Fotofermentację przeprowadzają heterotroficzne bakterie fotosyntetyzujące (*Rhodobacter sphaeroides*, *R. capsulatus*, *R. sulidophilus*, *Rhodopseudomonas*



Rys. 1. Schemat bezpośredniej biofotolizy wody



Rys. 2. Schemat wytwarzania wodoru w fotofermentacji

sphaeroides, *Halobacterium haobium*), których zdolność do wytwarzania wodoru jest możliwa dzięki działaniu nitrogenazy. Substratami dla tych przemian są kwasy organiczne np. kwas octowy:

$$CH_3COOH + 2H_2O \xrightarrow{hv} 2XO_2\ 4H_2 \qquad (5)$$

Standardowy potencjał termodynamiczny tej przemiany wynosi + 104 kJ/mol. Zatem wymaga ona dostarczania zewnętrznej energii. Mechanizm fotofermentacji przedstawiono na rysunku 2. Purpurowe bakterie mają tylko pojedynczy fotosystem (PS). Elektrony uwolnione z rozkładu substratu organicznego przenoszone są przez odpowiednie nośniki elektronów. W warunkach limitowania azotem, elektrony są wykorzystane przez nitrogenazę do redukcji azotu cząsteczkowego do amoniaku. W przypadku braku azotu cząsteczkowego, nitrogenaza może wykorzystać wytwarzaną energię do redukcji protonów do wodoru cząsteczkowego z udziałem elektronów dostarczanych przez ferredoksynę. Nitrogenaza jest bardzo wrażliwa na obecność tlenu i hamowna przez jony amonowe. Nie stwarza to jednak takich trudności jak w przypadku bezpośredniej biofotolizy wody, gdyż tlen nie jest wytwarzany w tych przemianach.

Maksymalna sprawność fotochemiczna w przypadku purpurowych bakterii wynosi 8,4% dla długości fali 522 nm i 19% dla promieniowania o długości 860 nm [1]. Wyznaczona na podstawie pomiarów doświadczalnych sprawność fotochemiczna zmienia się od 0,2% do 11,3% i zależy od rodzaju drobnoustrojów, budowy fotoreaktora, intensywności naświetlania i rodzaju pożywki [1]. Większe sprawności uzyskuje się dla małych intensywności naświetlenia (do 15 W/m^2), czemu towarzyszy mała szybkość wytwarzania wodoru.

5. Bioelektroliza wody

Przemiana związków organicznych, stanowiących produkty fermentacji wodorowej wymaga dostarczenia energii (równanie 5). Możliwe jest wykorzystanie energii elektrycznej w miejsce energii świetlnej. Schemat takiego procesu bioelektrolizy wody przedstawiono na rysunku 3. Urządzenie pracuje na takiej samej zasadzie jak mikrobiologiczne ogniwa paliwowe. Składa się z dwóch komór, anodowej i katodowej, przedzielonych membraną przepuszczającą protony. Na anodzie przebiega utlenianie substratu (np. kwasu octowego) z udziałem drobnoustrojów:

$$CH_3COOH + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 8H^+ + 8e^- \qquad (6)$$

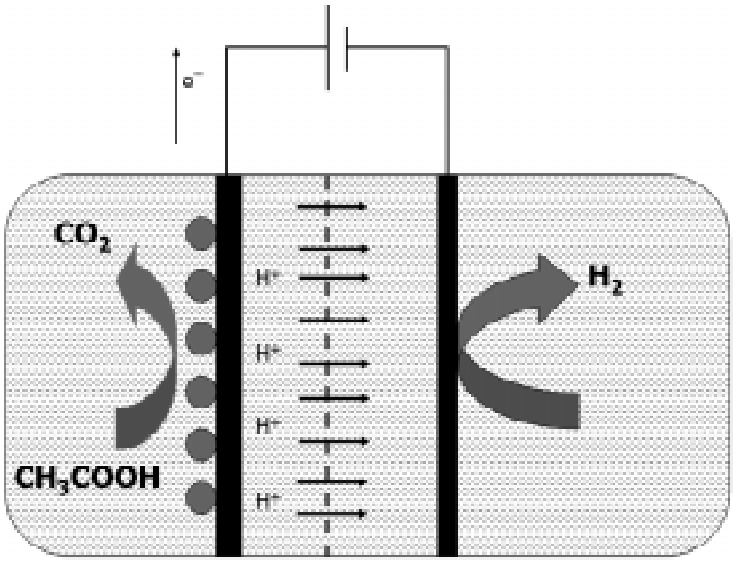
Standardowy potencjał tej przemiany wynosi – 0,098 V.

Wodór wydzielany jest na katodzie:

$$8H^+ + 8e^- \rightarrow 4H_2 \qquad (7)$$

Standardowy potencjał tej przemiany wynosi 0 V. Zatem można się spodziewać, że przy napięciach około 0,1 V możliwe jest wydzielanie wodoru. W praktyce stosowane napięcia są większe z uwagi na spadki napięcia na elektrodach i opory transportu w roztworze. Biolelektrolizę prowadzono dla napięć od 0,25 V do 0,5 V uzyskując 53–73% maksymalnej wydajności wodoru [20, 30]. Stosowane napięcia są znacznie mniejsze niż w tradycyjnej chemicznej elektrolizie wody (ok. 1,8–2V). W procesie bioelektrolizy uzyskuje się dodatni bilans energii: stosunek energii uzyskanej do zużytej wynosi 1,8 [24], zaś w tradycyjnej chemicznej elektrolizie ten stosunek wynosi 0,60–0,67.

Połączenie procesu biolektrochemicznego z ciemną fermentacją pozwala na uzyskanie 8–9 moli wodoru



Rys. 3. Schemat elektrolizy wody wspomaganej mikrobiologicznie

z mola glukozy [20]. Szczególnie atrakcyjnie rysują się perspektywy tej metody produkcji wodoru w przypadku wykorzystania ścieków i odpadów organicznych.

6. Biokonwersja tlenku węgla

Niektóre fotoheterotroficzne bakterie z rodziny *Rhodospirillaceae* mogą, w ciemności, wykorzystywać tlenek węgla jako źródło węgla do wytwarzania energii z jednoczesnym uwalnianiem wodoru [13, 23]. Tlenek węgla może pochodzić z termicznej gazyfikacji biomasy. Utlenianie tlenku węgla do ditlenku węgla z uwolnieniem wodoru przebiega zgodnie z reakcją:

$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2 \quad \Delta G^{0'} = -20\text{kJ / mol} \qquad (8)$$

W przypadku bakterii *Rhodospirillum rubrum* hodowanych w rektorze przepływowym uzyskano stopień konwersji tlenku węgla 81,6% jednak wymagany był dodatek octanu w celu potrzymania wzrostu drobnoustrojów [11].

Purpurowe bakterie niesiarkowe *Rubrivivax gelatinosus* w ciemności przekształcają tlenek węgla wytwarzając prawie stechiometryczne ilości wodoru zaś naświetlane wykorzystują CO jako główne źródło węgla do budowy materiałów komórkowych [18, 23].

7. Fermentacja wodorowa

Wodór może być wytwarzany przez bakterie anaerobowe, rosnące w ciemności na substratach węglowodanowych. Fermentacja przebiega zarówno w warunkach mezofilnych (25–40°C), termofilnych (40–65°C) a także ekremotermofilnych (65–80°C) [18]. Bakterie zdolne do takiej fermentacji należą do rodzajów *Enterobacter*, *Bacillus* i *Clostridium*. Preferowanymi substratami dla fermentacji wodorowej są węglowodany. Wytwarzanie wodoru przez bakterie heterotroficzne ma wiele zalet: dużą szybkość wytwarzania wodoru w porównaniu z metodami fitobiologicznymi oraz możliwość wykorzystania jako surowców odpadów organicznych [8, 9, 12, 28].

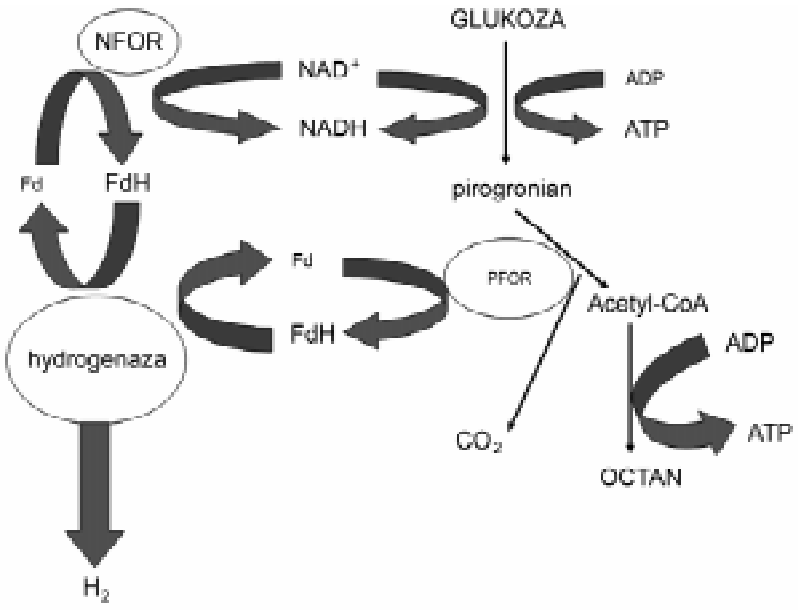
Maksymalna teoretyczna wydajność wodoru wynosi 12 moli H_2 na mol heksozy:

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 6CO_2 + 12H_2$$
$$\Delta G^{0'} = -25\text{ kJ / mol} \qquad (9)$$

Efekt energetyczny takiej przemiany jest bardzo mały i nie może być wykorzystany przez drobnoustroje. W praktyce wydajności wodoru są mniejsze i zależą do końcowych produktów fermentacji. W przypadku wytwarzania octanu uzyskuje się 4 mole H_2 z mola glukozy, zaś w przypadku powstawania kwasu propionowego wydajność wynosi 2 mole H_2 na mol glukozy.

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$$
$$\Delta G^{0'} = -182{,}4\text{ kJ / mol} \qquad (10)$$
$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$$
$$\Delta G^{0'} = -257{,}1\text{ kJ / mol} \qquad (11)$$

Przemiany metaboliczne prowadzące do wytworzenia wodoru z glukozy są dobrze poznane. Na rysunku 4 przedstawiono schemat wytwarzania wodoru przez klostridia [6]. Glukoza rozkładana jest w szlaku glikolizy do pirogronianiu. Powstające w procesie glikolizy elektrony przenoszone są na NAD. Pirogronian jest utleniany przez oksyreduktazę priogronian:ferredoksyna (PFOR) do acetyl-CoA i ditlenku węgla, zaś elektrony są przenoszone na ferredoksynę. NADH może być utleniony przez oksyreduktazę NADH:Fd (NFOR),



Rys. 4. Schemat wytwarzania wodoru przez klostridia

elektrony zostają przeniesione na ferredoksynę. Wodór jest produkowany przez hydrogenazę, która katalizuje redukcję protonów wykorzystując przy tym elektrony z ferredoksyny. Wytwarzanie wodoru jest kontrolowane termodynamiczne przez stężenie wodoru cząsteczkowego [2]. PFOR może katalizować reakcję redukcji protonów dla ciśnień cząstkowych wodoru poniżej 30 kPa co odpowiada warunkom panującym w bioreaktorach. Z kolei NFOR może prowadzić wytwarzanie wodoru jedynie dla ciśnienia cząstkowego wodoru mniejszego do 60–100 Pa, co wymaga stworzenia odpowiednich warunków w bioreaktorze.

Tlen jest inhibitorem hydrogenazy i hamuje wzrost bezwzględnych beztlenowców oraz wytwarzanie wodoru. Dlatego dobre efekty uzyskuje się stosując heterogeniczne populacje mikroorganizmów, w których obecne są względne beztlenowce m.in.: *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae.* Mikroorganizmy te przyswajają zawarty w środowisku tlen, co nie hamuje wytwarzania wodoru również przez *Clostridium* spp. Pozwala to na uzyskanie wodoru z większą wydajnością niż podczas stosowania monokultur [35].

Uzyskanie wysokich wydajności produkcji wodoru wymaga usunięcia z mieszanej populacji drobnoustrojów organizmów, które mogą zużywać wodór: metanogenów i acetogenów. Usunięcie metanogenów z osadu czynnego uzyskuje się bądź przez obróbkę termiczną lub dobór odpowiednich warunków prowadzenia procesu. Zagrzanie osadu beztlenowego do temperatury ok. 80–104°C powoduje zabicie metanogenów, podczas gdy tworzące spory bakterie takie jak *Clostridium*, *Bacillus* i *Thermoanaerobacterium* zostają zachowane [15, 29, 36]. Usunięcie metanogenów z bioreaktora jest także możliwe dzięki kontrolowaniu warunków fermentacji. W przypadku reaktorów przepływowych, stosowanie czasów przebywania 6–12 h oraz pH ok. 5.5 powoduje wymywanie metanogenów [10, 17]. Istnieje jednak możliwość tworzenia się na ściankach lub innych elementach bioreaktora biofilmu zawierającego metanogeny, co zmniejsza wydajność procesu [14, 31, 36]

Wspomniane wyżej ograniczenia termodynamiczne wskazują, że zmniejszenie ciśnienia cząstkowego wodoru w reaktorze sprzyja jego wytwarzaniu. W badaniach laboratoryjnych w celu usunięcie gazowych produktów fermentacji wodorowej stosowano przepuszczanie przez fermentor gazów obojętnych [15] lub prowadzenie procesu pod obniżonym ciśnieniem [22]. Metody te związane są z dodatkowym zużyciem energii. Za to wykorzystanie półprzepuszczalnej membrany do usuwania gazów z brzeczki fermentacyjnej może zwiększyć wydajność wytwarzania wodoru bez dodatkowych nakładów energetycznych [19].

Wartość pH ma duży wpływ na wytwarzanie wodoru przez mikroorganizmy. Od wartości pH zależy m.in. aktywność hydrogenazy oraz droga przemian metabolicznych. Optymalne pH dla wytwarzania wodoru, gdy substratem jest glukoza, to ok. 5,5 [5].

Wzrost temperatury sprzyja wytwarzaniu wodoru [6]. Dla bakterii termofilnych i hipertermofilnych uzyskiwano wydajności wytwarzania wodoru zbliżone do maksymalnej wartości 4 mole H_2/mol glukozy. Jednocześnie szybkość wytwarzania wodoru była znacznie mniejsza niż w przypadku procesów mezofilnych.

Inżyniera metaboliczna może być wykorzystana do zwiększenia wydajności wodoru w fermentacji wodorowej. Ogólna idea polega na takich zmianach szlaków

metabolicznych by zwiększyć strumienie w szlakach prowadzących do wytworzenia wodoru. Dla przykładu, osłabienie dehydrogenazy mleczanowej może spowodować zwiększenie ilości pirogronianiu utlenianego przez PFL. Uzyskano szczep bakterii *E. cloacae* ze zmniejszoną aktywnością dehydrogenazy alkoholowej, który wytwarzał znacznie mniejsze ilości kwasu mlekowego i masłowego [16]. To przekierowanie metabolizmu spowodowało wzrost wydajności wodoru do 2,5 mola H_2/mol glukozy.

W porównaniu z innymi technikami biologicznymi wytwarzania wodoru ciemna fermentacja zapewnia duże szybkości produkcji gazu, co oznacza mniejsze koszty aparatury [18]. Nawet w przypadku najbardziej wydajnej fermentacji wodorowej, uzyskuje się jedynie 1/3 stechiometrycznej ilości wodoru i kwasy organiczne, które wymagają dalszego zagospodarowania. Jednym ze sposobów jest przeprowadzenie fotofermentacji heterotroficznej, omówionej powyżej. Innym znacznie prostszym sposobem, jest wykorzystanie odcieku po fermentacji wodorowej jako surowca do fermentacji metanowej [3, 32, 33]. Zastosowanie procesów hybrydowych tzn. połączenie ciemnej fermentacji z fotofermentacją, bioelektrolizą bądź fermentacją metanową umożliwia uzyskanie wysokich sprawności energetycznych (ponad 80% energii zawartej w surowcu jest przekształcana do wodoru). W porównaniu ze stosowaną obecnie metodą reformingu gazu ziemnego, biologiczne metody wytwarzania wodoru cechuje bardzo korzystny bilans energetyczny. Stosunek energii uzyskanej w postaci wodoru do nakładów energetycznych w jego wytwarzaniu wynosi w przypadku reformingu gazu ziemnego 0,64 zaś w przypadku metod biologicznych wynosi od 1,9 (ciemna fermentacja) do 3, 0 (fotofermentacja, procesy hybrydowe) [24].

8. Podsumowanie

Wodór może być produkowany różnymi metodami biologicznymi. Bezpośrednia fotoliza wody ma ograniczone zastosowanie z uwagi na niską wydajność i dużą wrażliwość hydrogenazy na tlen. W przypadku dwustopniowej biofotolizy możliwości praktycznego wykorzystania są ograniczone z uwagi na małą szybkość procesu i wysokie koszty fotobioreaktorów. Najbardziej obiecujące metody biologiczne, z których można uzyskać wodór cząsteczkowy z dużą wydajnością to: fotofermentacja, ciemna fermentacja wodorowa oraz bioelektroliza. Technologie te znajdują się obecnie na etapie badań laboratoryjnych. Ich wykorzystanie w praktyce wymaga uzyskania odpowiednio wysokich szybkości wytwarzania wodoru zapewniających odpowiednie zasilanie silników lub ogniw paliwowych. Z kolei konkurencja z innymi nośnikami energii wymaga niskich kosztów produkcji. Można to osiągnąć wykorzystując surowce odpadowe oraz zwiększając efektywność poszczególnych technik. Z tego powodu biologiczne wytwarzanie wodoru, który może być paliwem przyszłości, jest obecnie przedmiotem intensywnych i różnorodnych badań.

Praca finansowana w ramach projektu badawczego rozwojowego R12 0041 04 przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Piśmiennictwo

1. Akkerman I., Janssen M., Rocha J., Wijffels R.H.: Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1195–1200 (2002)
2. Angenent L.T., Karim K., Al-Dahhan M.H., Wrenn B.A., Domiguez-Espinosa R.: Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* **22**, 477–485 (2004)
3. Cooney M., Maynard N., Cannizzaro C., Benemann J.: Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures. *Bioresource Technol*. **98**, 2641–2651 (2007)
4. Das D., Veziroglu T. N.: Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy*, **26**, 13–28 (2001)
5. Fang H. H.P., Liu H.: Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technol*. **82**, 87–93 (2002)
6. Hallenbeck P.C.: Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci.Technol.* **52**, 21–29 (2005)
7. Hallenbeck P.C., Benemann J.R.: Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1185–1183 (2002)
8. Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L., Hussy I.: Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1339–1347 (2002)
9. Hawkes F.R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R., Hawkes D.L.: Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**, 172–184 (2007)
10. Hussy I., Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L.: Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *Int. J. Hydrogen Energy*, **30**, 471–483 (2005)
11. Ismail K.S.K., Najafpour G., Younesi H., Mohamed A.R., Kamaruddin A.H.: Biological hydrogen production from CO: Bioreactor performance. *Biochem. Engng. J.* **39**, 468–477 (2008)
12. Kapdan I.K., Kargi F.: Bio-hydrogen production from waste materials. *Enz. Microbial Technol.* **38**, 569–582 (2006)
13. Kerby R.L., Ludden P.W., Robert G.P.: Carbon monooxide-depended growth of Rhodospirillum rubrum. *J. Bacteriol*. **169**, 4784–4789 (1995)
14. Kraemer J.T., Bagley D.M.: Continuous fermentative hydrogen production using a two-phase reactor system with recycle. *Environ. Sci. Technol*. **39**, 3819–3825 (2005)
15. Kraemer J.T., Bagley D.M.: Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letters*, **29**, 685–695 (2007)

16. Kumar N., Ghosh A., Das D.: Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H2 production by *Enterobacter cloacae. Biotechnology Letters*, **23**, 537–541 (2001)
17. Lay J-J.: Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol. Bioeng*. **68**, 269–278 (2000)
18. Levin D.B., Pitt L., Love M.: Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 173–185 (2004)
19. Liang T.-M., Cheng S.S., Wu K.-L.: Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1157–1165 (2002)
20. Liu H., Grot S., Logan B.E.: Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 4317–4320 (2005)
21. Logan B.E.: Extracting hydrogen and electricity from renewable resources, *Environ. Sci. Technol*. **38**, 160A–167A (2004)
22. Mandal B., Nath K., Das D.: Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H_2 by *Enterobacter cloacae. Biotechnology Letters*, **28**, 831–835 (2006)
23. Maness P.C., Huang J., Smolinski S., Tek V., Vanzin G.: Energy generation from the CO oxidation-hydrogen production pathway in *Rubrivivax gelatinosus. Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2870–2874 (2005)
24. Manish S., Banerjee R.: Comparison of biohydrogen production processes, *Int. J. Hydrogen Energy*, **33**, 279–286 (2008)
25. Meher Kotay S., Das D.: Biohydrogen as a renewable energy resource-Prospects and potentials. *Int. J. Hydrogen Energy*, **33**, 258–263 (2008)
26. Melis A., Zhang L.P., Forestier M., Ghirardi M.L., Seibert M.: Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, **122**, 127–135 (2000)
27. Momirlan M., Veziroglu T.N.: Current status of hydrogen energy, *Renew. Sust. Enereg. Rev*. **6**, 141–179 (2002)
28. Nishio N., Nakashimada Y.: High rate production of hydrogen/methane from various substrates and wastes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. **90**, 63–87 (2004)
29. Oh S.E., Van Ginkel S., Logan B.E.: The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ. Sci. Technol*. **37**, 5186–5190 (2003)
30. Rozendal R.A., Hamelers H.V.M., Euverink G.J.W., Metz S.J., Buisman C.J.N.: Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 1632–1640 (2006)
31. Shizas I., Bagley D.M.: Fermentative hydrogen production in a system using anaerobic digester sludge without heat treatment as a biomass source. *Water Sci. Technol*. **52**, 139–144 (2005)
32. Ueno Y., Tatara M., Fukui H., Makiuchi T., Goto M., Sode K.: Production of hydrogen and methane from organic solid wastes by phase-separation of anaerobic process. *Bioresource Technol*. **98**, 1861–1865 (2007)
33. Venkata Mohan S., Mohanakrishna G., Sarma P.N.: Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *Int. J. Hydrogen Energy*, **33**, 2156–2166 (2008)
34. Vignais P.M., Colbeau A.: Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr. Iss. Molec. Biol*. **6**, 159–188 (2004)
35. Yoki H., Tokushige T.: H_2 production from starch by a mixed culture of *Cl. butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters*, **20**, 143–147 (1998)
36. Zhu H., Béland M.: Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 1980–1988 (2006)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 249–256
http://www.pm.microbiology.pl

DROŻDŻOWE SYSTEMY EKSPRESYJNE JAKO NARZĘDZIE NOWOCZESNEJ MIKROBIOLOGII PRZEMYSŁOWEJ

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Marta Wanarska*, Piotr Hildebrandt, Józef Kur

Katedra Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, tel. (58) 347 16 05
* Autor korespondencyjny: e-mail: martka.chem@wp.pl

1. Wprowadzenie. 2. Podstawowe właściwości biochemiczne *P. pastoris*, *H. polymorpha*, *A. adeninivorans* i *Y. lipolytica*. 3. Drożdżowe systemy ekspresyjne. 4. Produkcja białek i etanolu przez rekombinantowe szczepy drożdży. 5. Podsumowanie

Yeast expression systems as a tool in modern industrial microbiology

Abstract: Yeast combine advantages of the prokaryotic and eukaryotic expression systems. They retain the advantage of bacteria in growth rate, but in contrast to these latter, they produce much more biomass, perform the post-translational processing of polypeptides and also are able to secrete high levels of heterologous proteins. The initial yeast system developed for heterologous gene expression was based on the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However, this system was soon found to have certain limitations like low product yield, low secretion capacities, hyperglycosylation or poor plasmid stability. To overcome these limitations, alternative yeast systems were developed. In this article, we review *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* expression systems. We describe also some examples of proteins and other metabolites which were produced using recombinant yeast strains.

1. Introduction. 2. Basic biochemical properties of *P. pastoris*, *H. polymorpha*, *A. adeninivorans* and *Y. lipolytica*. 3. Yeast expression systems. 4. Protein and etanol production by recombinant yeast strains. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Arxula adeninivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, system ekspresyjny, *Yarrowia lipolytica*
Key words: *Arxula adeninivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, expression system, *Yarrowia lipolytica*

1. Wprowadzenie

Drożdże łączą zalety prokariotycznych i eukariotycznych systemów ekspresyjnych. Charakteryzuje je szybki wzrost, osiągają też znacznie większą biomasę w porównaniu do bakterii, przekraczającą niekiedy 100 g sm/l hodowli [4, 24]. W odróżnieniu od bakterii, drożdże zdolne są do przeprowadzania modyfikacji posttranslacyjnych białek (N- i O-glikozylacji, tworzenia mostków disiarczkowych, proteolitycznego dojrzewania), często niezbędnych dla prawidłowej funkcji białek pochodzących z organizmów wyższych. Kolejną zaletą drożdżowych systemów ekspresyjnych jest zdolność komórek drożdżowych do sekrecji białek do pożywki hodowlanej. Dzięki zastosowaniu szczepu drożdżowego produkującego białko zewnątrzkomórkowo, możliwe jest wyeliminowanie kilku etapów otrzymywania białek rekombinantowych, które są niezbędne w przypadku produkcji białek w bakteriach, np. lizy komórek, czy wieloetapowych procesów oczyszczania. W laboratoriach naukowych i przemyśle jako pierwszy zastosowany został system drożdżowy *Saccharomyces cerevisiae*, np. do przemysłowej produkcji insuliny czy HBsAg (białka S wirusa zapalenia wątroby typu B) [14]. Nie spełnia on jednak w pełni wymagań nowoczesnych biotechnologii ze względu na niski poziom produkcji i sekrecji białek, niestabilność plazmidów rekombinantowych, hiperglikozylację heterologicznych polipeptydów oraz wąski zakres substratów wykorzystywanych jako źródło węgla i energii. Przezwyciężenie tych problemów umożliwiło opracowanie systemów ekspresyjnych opartych o inne gatunki drożdży, jak *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *P. methanolica*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, czy *Arxula adeninivorans*. Obecnie najczęściej wykorzystywane są układy oparte o metylotroficzne drożdże *P. pastoris* i *H. polymorpha*, które zapewniają niezwykle wysoką wydajność zewnątrzkomórkowej produkcji heterologicznych białek, przekraczającą niekiedy 10 g/l pożywki pohodowlanej [24]. Duży potencjał biotechnologiczny posiadają też dimorficzne drożdże *A. adeninivorans* i *Y. lipolytica*. Natomiast celem konstrukcji rekombinantowych szczepów *S. cerevisie* jest obecnie wykorzystanie ich do produkcji metabolitów niebiałkowych, głównie etanolu, z niekonwencjonalnych źródeł węgla, np. laktozy zawartej w serwatce. Przedstawiona w pracy charakterystyka systemów ekspresyjnych *P. pastoris*, *H. polymorpha*, *A. adeninivorans* i *Y. lipolytica* obejmować będzie szczepy gospodarzy ekspresyjnych oraz wektory ekspresyjne z uwzględnieniem sekwencji promotorowych, markerów selekcyjnych

oraz sekwencji umożliwiających utrzymanie się obcego DNA w komórkach drożdży. Zaprezentowane zostaną sekwencje sygnalne pozwalające na zewnątrzkomórkową produkcję rekombinantowych białek oraz możliwości zwiększenia wydajności ich sekrecji. Przytoczone zostaną również przykłady zastosowania rekombinantowych drożdży do produkcji heterologicznych białek i etanolu.

2. Podstawowe właściwości biochemiczne *P. pastoris*, *H. polymorpha*, *A. adeninivorans* i *Y. lipolytica*

P. pastoris i *H. polymorpha* należą do drożdży metylotroficznych, zdolnych do wykorzystywania metanolu jako jedynego źródła węgla i energii. Katabolizm metanolu wymaga obecności w komórce specyficznych enzymów, z których pierwszy – oksydaza alkoholowa katalizuje reakcję utlenienia metanolu do formaldehydu. Powstający nadtlenek wodoru jest rozkładany przez katalazę. Obie reakcje zachodzą w peroksysomach, w celu zabezpieczenia komórki przed toksycznym działaniem nadtlenku wodoru. Część powstającego formaldehydu opuszcza peroksysomy i jest utleniana w cytoplazmie do kwasu mrówkowego, a następnie dwutlenku węgla, w reakcjach katalizowanych przez dehydrogenazę formaldehydową i dehydrogenazę mrówczanową, co stanowi źródło energii dla komórek. Pozostały w peroksysomach aldehyd mrówkowy ulega reakcji kondensacji z ksylulozo-5-fosforanem, zaś powstające w jej wyniku dihydroksyaceton i aldehyd 3-fosfoglicerynowy włączane są do zachodzącego w cytoplazmie cyklu przemian prowadzących do powstania aldehydu 3-fosfoglicerynowego, wykorzystywanego do syntez komórkowych. Reakcja kondensacji katalizowana jest przez obecną w peroksysomach syntazę dihydroksyacetonu. Regulacja ekspresji genów kodujących enzymy biorące udział w metabolizmie metanolu – oksydazy alkoholowej (AOX), dehydrogenazy mrówczanowej (FMD) oraz syntazy dihydroksyacetonu (DHAS), oparta jest na mechanizmie represji/derepresji oraz indukcji w obecności różnych źródeł węgla. Represja występuje w obecności glukozy i etanolu, derepresja – glicerolu, zaś metanol jest induktorem ekspresji genów. W komórkach *P. pastoris* transkrypcja z promotora *AOX1* zachodzi jedynie w obecności induktora – metanolu lub jego pochodnych. Ogromną zaletę drożdży *H. polymorpha* stanowi natomiast fakt, iż do aktywacji promotorów *AOX*, *FMD* i *DHAS* wystarcza derepresja w obecności glicerolu lub ściśle limitowanych ilości glukozy (głodzenie glukozowe). Innymi cechami odróżniającymi *H. polymorpha* od *P. pastoris* są zdolność do asymilacji azotanów, a także termotolerancyjność. Optymalna temperatura wzrostu *P. pastoris* wynosi 30°C, zaś *H. polymorpha* 37–43°C. Sugeruje się, że wyższa temperatura wzrostu może być korzystna w przypadku produkcji białek ssaczych, również ludzkich, w komórkach drożdży [4, 9].

Podobnie jak *H. polymorpha*, również *A. adeninivorans* charakteryzuje się termotolerancyjnością oraz zdolnością do asymilacji azotanów. Ponadto, drożdże te wykazują temperaturozależny dimorfizm, który szczególnie mocno objawia się w przypadku szczepu *A. adeninivorans* LS3 wyizolowanego z hydrolizatów drewna na Syberii. Szczep ten zachowuje zdolność wzrostu w temperaturze do 48°C, jednak w temp. przekraczającej 42°C zmienia formę morfologiczną z pojedynczych komórek na strzępki. Zmianie tej towarzyszy zwiększenie poziomu sekrecji białek do pożywki hodowlanej oraz inny sposób glikozylacji. Badania wykazały, że *A. adeninivorans* hodowana w 45°C syntetyzuje dwukrotnie więcej zewnątrzkomórkowej glukoamylazy i inwertazy od szczepu hodowanego w 30°C. Ponadto wykazano, iż O-glikozylacja białka Afet3p, biorącego udział w transporcie jonów żelaza, zachodziła jedynie w pojedynczych komórkach drożdży, podczas gdy N-glikozylacja w obu formach morfologicznych. Cecha ta może mieć duże znaczenie przy produkcji potencjalnych leków białkowych w komórkach drożdży, ponieważ umożliwia porównanie aktywności biologicznej oraz immunogenności O-glikozylowanych i nie-O-glikozylowanych polipeptydów. Kolejnymi zaletami tych dimorficznych drożdży jest osmotolerancyjność oraz zdolność do wykorzystywania różnych związków jako źródła węgla, azotu i energii. *A. adeninivorans* asymiluje szeroką gamę węglowodanów, w tym skrobię, alkohole (z wyłączeniem metanolu), diole, kwasy karboksylowe i dikarboksylowe, n-alkany, a także pierwszorzędowe alkiloaminy [12, 25, 26, 44, 45].

Dimorfizm oraz zdolność do asymilacji niekonwencjonalnych źródeł węgla wykazuje również *Y. lipolytica*. Drożdże te metabolizują glukozę, etanol, octan oraz związki hydrofobowe jak n-alkany i kwasy tłuszczowe, nie są natomiast zdolne do asymilacji sacharozy. Dzikie szczepy *Y. lipolytica* hodowane w pożywkach zawierających n-alkany jako źródło węgla produkują zewnątrzkomórkowo mieszaninę kwasu cytrynowego i izocytrynowego. Natomiast w obecności n-alkanów oraz przy obniżonej zawartości tiaminy wydzielają duże ilości α-ketoglutaranu. Drożdże te wykazują również zdolność do sekrecji znacznych ilości białek. *Y. lipolytica* hodowana w bogatej pożywce w pH 6,8 produkuje zewnątrzkomórkowo alkaliczną proteazę w ilości 1–2 g/l hodowli. Obniżenie pH do 4,0 sprzyja wydzielaniu kwaśnej proteazy. Dodatkowo *Y. lipolytica* produkuje zewnątrzkomórkowo RNazę, kwaśną fosfatazę, lipazę oraz esterazę. Tworzenie przez *Y. lipolytica* strzępek uzależnione jest od szczepu oraz warunków środowiska. Procesowi temu sprzyja obecność N-acetyloglukozaminy jako jedynego źródła węgla w pożywce hodowlanej. Maksymalna temperatura wzros-

tu większości szczepów *Y. lipolytica* nie przekracza 32–34°C, dlatego też drożdże te nie są patogenne dla człowieka i mogą służyć do produkcji związków wykorzystywanych w przemyśle spożywczym np. kwasu cytrynowego [2]. Stwarza to również możliwość zastosowania ich do produkcji białek dla przemysłu spożywczego czy farmaceutycznego.

3. Drożdżowe systemy ekspresyjne

Każdy system ekspresyjny składa się z wektora ekspresyjnego oraz komórek gospodarza. Drożdżowe wektory ekspresyjne są wektorami wahadłowymi zawierającymi elementy pochodzenia bakteryjnego, umożliwiające klonowanie genów i namnożenie DNA powstałego konstruktu w komórkach *E. coli* – *origin* replikacji i marker selekcyjny oraz elementy pochodzenia drożdżowego umożliwiające łatwą selekcję rekombinantów, wydajną ekspresję klonowanego genu, jak również autonomiczną replikację lub integrację wprowadzonego DNA z genomem gospodarza ekspresyjnego.

Wektory plazmidowe stosowane w systemie ekspresji *P. pastoris* zawierają sekwencje promotorowe *AOX1*, *FLD1*, *GAP*, *PEX8* czy *YPT1* oraz sygnał terminacji transkrypcji *AOX1*[4]. Promotor genu oksydazy alkoholowej (*AOX1*) to silny promotor indukowany metanolem [4]. Promotor genu dehydrogenazy formaldehydowej (*FLD1*) może być indukowany zarówno metanolem, jak i nietoksyczną metyloaminą [37], natomiast promotor genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*GAP*) umożliwia wydajną konstytutywną ekspresję genów klonowanych pod jego kontrolę [47]. Promotor *PEX8* zapewnia niski poziom ekspresji genu, gdy komórki *P. pastoris* hodowane są w pożywce zawierającej glukozę oraz 3–5-krotny wzrost poziomu ekspresji po zmianie źródła węgla na metanol [4], zaś *YPT1* to słaby konstytutywny promotor aktywny zarówno w obecności glukozy, jak i metanolu [36].

Najczęściej wykorzystywanymi drożdżowymi markerami selekcyjnymi są: *Sh ble* – gen oporności na Zeocynę oraz markery auksotroficzne – geny *HIS4 P. pastoris* lub *S. cerevisiae* i *ARG4 S. cerevisiae*. Scharakteryzowano również inne markery selekcyjne *P. pastoris*, np. *URA3* czy *ADE1* [4].

Wektory ekspresyjne wykorzystywane w systemie *P. pastoris* ulegają integracji z genomem gospodarza drożdżowego w obrębie promotora *AOX1*, promotora *GAP* lub sekwencji markera selekcyjnego, na drodze rekombinacji homologicznej. W wyniku transformacji liniową formą DNA plazmidowego, jedna kopia wektora włączana jest do genomu *P. pastoris*. Możliwe jest jednak skonstruowanie szczepów rekombinantowych zawierających więcej kopii obcego genu w obrębie genomu [4].

Wszystkie ekspresyjne szczepy *P. pastoris* pochodzą od szczepu Y-11430 i zawierają mutacje w jednym lub kilku genach, objawiające się odpowiednią auksotrofią. Większość ekspresyjnych szczepów *P. pastoris*, podobnie jak szczep dziki, zawiera dwa geny oksydazy alkoholowej *AOX1* oraz *AOX2* i jest zdolna do szybkiego wzrostu w pożywce zawierającej metanol (fenotyp Mut^+). Skonstruowano jednak szczepy posiadające delecję w obrębie genu *AOX1*, które wolno rosną w pożywce z metanolem, jednak w niektórych przypadkach produkują heterologiczne białka z większą wydajnością i nie wymagają do ekspresji genów tak dużej ilości metanolu jak szczepy Mut^+, co jest szczególnie ważne przy produkcji białek na skalę przemysłową. Przykładem takiego szczepu jest *P. pastoris* KM71, gdzie gen *AOX1* został częściowo usunięty i zastąpiony genem *ARG4 S. cerevisiae*. Skonstruowano również szczepy ekspresyjne, w których zmutowano geny kodujące obecne w wakuolach proteazy. Szczepy te wykazują zmniejszony poziom degradacji obcych białek, zwłaszcza przy produkcji na dużą skalę, gdzie liza nawet niewielkiego odsetka komórek powoduje stosunkowo wysokie straty zewnątrzkomórkowych polipeptydów [4]. Przykłady ekspresyjnych szczepów *P. pastoris* przedstawiono w tabeli I.

Podobnie, jak u wcześniej opisanych metylotrofów, również u *H. polymorpha* silne indukowane promotory genów kodujących enzymy biorące udział w metabolizmie metanolu zostały wykorzystane do konstrukcji wektorów ekspresyjnych: promotor oksydazy metanolowej (*MOX*), syntazy dihydroksyacetonu (*DHAS*) i dehydrogenazy mrówczanowej (*FMD*) [9]. Zastosowano również słabszy promotor genu oksydazy aminowej (*AMO*), którego induktorami są pierwszorzędowe aminy np. metylo- i etyloamina, zaś całkowita represja występuje w obecności jonów amonowych [49]. Rzadziej wykorzystywane są promotory genów kodujących enzymy ze szlaku asymilacji azotanów (*YNT1*, *YNI1* i *YNR1*), które są indukowane przez azotany, a ulegają represji w obecności jonów amonowych [1]. Przykładami silnych konstytutywnych promotorów są *PMA1* (promotor genu ATPazy błony cytoplazmatycznej) [6, 17] i *GAP* (promotor genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego) [15].

Markery selekcyjne wektorów ekspresyjnych obejmują geny *LEU1.1*, *URA3*, *TRP3* i *ADE11 H. polymorpha* oraz geny *LEU2* i *URA3 S. cerevisiae*. Ponadto, wykorzystywane są geny oporności na antybiotyki pleomycynę i zeocynę [9].

Autonomiczną replikację wektorów ekspresyjnych w komórkach *H. polymorpha* zapewniają sekwencje HARS. Dla otrzymania trwałych rekombinantów wykorzystywane są natomiast sekwencje genów kodujących oksydazę alkoholową i oksydazę aminową [9]. Zastosowanie wektora zawierającego gen *LEU2*

lub *URA3 S. cerevisiae* oraz odpowiedniego szczepu *H. polymorpha leu1.1* lub *ura3* prowadzi do otrzymania transformantów zawierających wiele kopii wektora w obrębie genomu drożdżowego gospodarza, ze względu na fakt, iż geny *S. cerevisiae* słabo komplementują auksotrofię *H. polymorpha* [18, 34].

Ekspresyjne szczepy *H. polymorpha* są auksotrofami pochodzącymi od trzech szczepów macierzystych *H. polymorpha* DL-1, *H.polymorpha* NCYC495 i *H. polymorpha* CBS4732 (tab. I).

Systemy ekspresyjne opracowane zostały także dla dimorficznych drożdży *A. adeninivorans* i *Y. lipolytica*. Wektory ekspresyjne przeznaczone dla *A.adeninivorans* zawierają, oprócz elementów pochodzenia bakteryjnego, silny konstytutywny promotor *TEF1 A. adeninivorans*, terminator transkrypcji *PHO5 S. cerevisiae*, marker selekcyjny w postaci genu *LEU2 A. adeninivorans* (*ALEU2*) [3], *TRP1 A. adeninivorans* (*ATRP1*) [39] lub genu *hph E. coli* nadającego rekombinantowym szczepom drożdży oporność na higromycynę B [46], a także sekwencję 25S rDNA umożliwiającą integrację DNA wektora z genomem *A. adeninivorans* [39, 46]. Transformacja komórek drożdży DNA takich wektorów prowadzi do uzyskania zazwyczaj tylko jednej kopii wektora zintegrowanej z genomem gospodarza [38]. Na integrację wielu kopii DNA wektora ekspresyjnego z genomem *A. adeninivorans* pozwoliło natomiast zastosowanie jako markera selekcyjnego genu A*TRP1* będącego pod kontrolą tylko krótkiego fragmentu promotora genu *ALEU2* (53 pz). Niski poziom ekspresji genu A*TRP1* kompensowany był przez wielokrotną integrację [40].

Mutanty auksotroficzne *A. adeninivorans* wykorzystywane jako szczepy ekspresyjne pochodzą od macierzystego szczepu *A. adeninivorans* LS3. Uzyskano również szczepy, które w przeciwieństwie do szczepu dzikiego, tworzą strzępki już w temperaturze 30°C (tab. I).

W przypadku systemu ekspresji *Y. lipolytica*, istnieją zarówno autonomiczne, jak i integracyjne wektory ekspresyjne. Pierwsze z nich zawierają sekwencje ARS *Y. lipolytica*, pełniące zarówno funkcję centromeru, jak i *origin* replikacji [2]. W komórkach drożdży są bardzo stabilne, ale występują w bardzo niewielkiej ilości kopii, 1–3/komórkę [23, 43]. Wektory integracyjne mogą być włączane do genomu *Y. lipolytica* na drodze rekombinacji homologicznej, która jest silnie stymulowana przez linearyzację DNA wektora w obrębie homologicznej do genomu sekwencji. Na tej drodze zachodzi integracja pojedynczej kopii DNA wektora ekspresyjnego z genomem drożdży. Dla zwiększenia ilości kopii wektora zintegrowanego z genomem gospodarza wykorzystuje się kombinację sekwencji rDNA i defektywnego markera selekcyjnego *ura3d4* [21] lub sekwencje LTR retrotranspozonu Ylt1 zwane sekwencjami „zeta". Sekwencje „zeta" zapewniają wielokrotną integrację na drodze rekombinacji homologicznej w szczepach *Y. lipolytica* niosących retrotranspozon Ylt1 lub niehomologiczną integrację w szczepach nie niosących Ylt1 [28].

Tabela I

Ekspresyjne szczepy *P. pastoris*, *H. polymorpha*, *A. adeninivorans* i *Y. lipolytica*

Szczep	Fenotyp	Piśmiennictwo
P. pastoris		
Y-11430	Szczep dziki	NRRL-Y-11430
GS115	His^-, Mut^+	[7]
SMD1168	His^-, $Pep4^-$, Mut^+	[12]
KM71	His^-, Mut^s	[40]
GS190	Arg^-	[5]
JC254	Ura^-	[8]
JC227	Ade^- Arg^-	[5]
JC305	Ade^- Ura^-	[5]
JC300	Ade^- Arg^- His^-	[5]
JC303	Arg^- His^- Ura^-	[5]
JC308	Ade^- Arg^- His^- Ura^-	[5]
H. polymorpha		
DL-1	Szczep dziki	ATCC26012
DL-1-L	Leu^-	[11]
DL10	Leu^-, Ura^-	[11]
uDLB11	Leu^-, Ura^-, $Pep4^-$	[11]
NCYC495	Szczep dziki	[21]
L1	Leu^-	[11]
A11	Ade^-	[11]
CBS4732	Szczep dziki	ATCC34438
LR9	Ura^-	[11]
A. adeninivorans		
LS3	Szczep dziki	[11]
135	Adm^- (strzępki w 30°C)	[44]
G1211	Leu^-	[44]
G1212	Trp^-	[38]
Y. lipolytica		
W29	Szczep dziki	ATCC20460
Po1d	Leu^-, Ura^-, ΔAEP, Suc^+	[20]
Po1f	Leu^-, Ura^-, ΔAEP, ΔAXP, Suc^+	[22]
Po1g	Leu^-, ΔAEP, ΔAXP, Suc^+, pBR322	[22]
YLP21	Ura^-, ΔAEP, ΔAXP, Suc^+	[27]

Do ekspresji genów w komórkach *Y. lipolytica* jako pierwszy zastosowany został promotor genu zewnątrzkomórkowej alkalicznej proteazy (*XPR2*). Jednak, ze względu na fakt, iż jest on aktywny w pH powyżej 6 i do pełnej aktywności wymaga dużej ilości peptonu w pożywce hodowlanej, nie mógł być wykorzystywany w procesach przemysłowych [29]. Skonstruowano zatem promotor hybrydowy, zawierający 4 powtórzenia sekwencji UAS1 promotora *XPR2* oraz sekwencję TATA box promotora *LEU2*, który umożliwia ekspresję genów niezależnie od składu pożywki hodowlanej. Wykazano natomiast, że ekspresja genów będących pod kontrolą hybrydowego promotora uzależniona jest od fazy wzrostu hodowli *Y. lipolytica* i rozpoczyna się dopiero na początku fazy stacjonarnej [23]. Ponadto, do

ekspresji heterologicznych genów w komórkach *Y. lipolytica* wykorzystano promotory genów liazy izocytrynianowej (*ICL1)*, oksydazy acylo-CoA (*POX2*) i tiolazy 3-okso-acylo-CoA (*POT1*), które są silnie indukowane przez kwasy tłuszczowe i n-alkany, a ulegają represji w obecności glukozy bądź glicerolu. Dodatkowymi induktorami promotora *ICL1* są octan i etanol [19].

Podobnie, jak w przypadku opisanych wyżej drożdżowych systemów ekspresyjnych, do konstrukcji wek torów plazmidowych wykorzystywane są najczęściej auksotroficzne markery selekcyjne, np. geny *LEU2* [22], *URA3* [27] czy *ADE1*, chociaż stosuje się też gen oporności na pleomycynę oraz gen *SUC2* inwertazy *S. cerevisiae* nadający komórkom *Y. lipolytica* zdolność do wzrostu na podłożu zawierającym sacharozę [27].

Przykłady ekspresyjnych szczepów *Y. lipolytica*, posiadających mutacje delecyjne w genach kodujących auksotroficzne markery selekcyjne oraz zewnątrzkomórkowe proteazy przedstawiono w tabeli I.

Zewnątrzkomórkową produkcję heterologicznych białek przez rekombinantowe szczepy drożdży umożliwiają ich własne sekwencje sygnalne, które są zazwyczaj prawidłowo rozpoznawane w komórkach ekspresyjnego gospodarza. Jeżeli produkowane białko nie posiada własnej sekwencji sygnalnej, najbardziej uniwersalna jest sekwencja prepro peptydu α-faktora *S. cerevisiae*. W systemie ekspresji *P. pastoris* stosuje się ponadto pro sekwencję kwaśnej fosfatazy *P. pastoris* [4], natomiast sekrecję białek przez komórki *H. polymorpha* umożliwia również sekwencja sygnalna kwaśnej fosfatazy *H. polymorpha* [31] lub glukoamylazy *Schwanniomyces occidentalis* [48]. Drożdże *Y. lipolytica* wydajnie wydzielają heterologiczne białka do pożywki hodowlanej, jeżeli zawierają one sekwencje prepro peptydu zewnątrzkomórkowej alkalicznej proteazy [23, 28] lub lipazy *Y. lipolytica* [28, 32]. Wykazano, że poziom sekrecji obcych białek można zwiększyć poprzez wprowadzenie do komórek drożdży dodatkowych genów kodujących foldazy i białka opiekuńcze obecne w retikulum endoplazmatycznym, odpowiedzialne za prawidłowe składanie nowo zsyntetyzowanych polipeptydów. Jednym z tych białek jest kalneksyna – lektynowe białko opiekuńcze odpowiadające za prawidłowe składanie glikoprotein. Zwiększenie ilości kalneksyny w komórkach *H. polymorpha* pozwoliło na 2–3-krotne zwiększenie poziomu sekrecji czterech testowanych białek [20].

4. Produkcja białek i etanolu przez rekombinantowe szczepy drożdży

Stosując drożdżowe systemy ekspresyjne uzyskać można do 3 g białka z litra pożywki pohodowlanej. Ilości takie otrzymywano produkując albuminę osocza krwi ludzkiej (HSA), inwertazę *S. cerevisiae* czy oksydazę glukozową *Aspergillus niger* w komórkach *P. pastoris* i *H. polymorpha* [4, 16, 42]. Natomiast w przypadku systemu ekspresji *Y. lipolytica* wydajność produkcji była znacznie niższa, 100 mg endoglukanazy I *Trichoderma reesei* [30], czy 160 mg prochymozyny bydlęcej [23].

Wykorzystując metylotroficzne drożdże *H. polymorpha*, w jednym tylko przypadku uzyskano aż 13,5 g białka z litra pożywki pohodowlanej. Geny kodujące fitazę *Aspergillus terreus*, *A. fumigatus* i fitazę o zoptymalizowanej sekwencji (consensus phytase) klonowane były pod kontrolę silnego promotora *FMD*, a uzyskane szczepy rekombinantowe zawierały po kilkadziesiąt kopii genu zintegrowanego z genomem *H. polymorpha*. Zoptymalizowanie warunków hodowli drożdży pozwoliło na uzyskanie 4,46 g fitazy *A. terreus*, 6,1 g fitazy *A. fumigatus* oraz 13,49 g fitazy o zoptymalizowanej sekwencji z litra płynu pohodowlanego, przy zastosowaniu ściśle limitowanej ilości glukozy jako źródło węgla w hodowli dolewowej [24].

Porównanie wydajności zewnątrzkomórkowej produkcji interleukiny 6 przez drożdże *A. adeninivorans*, *H. polymorpha* i *S. cerevisiae* wykazało, że najwydajniejszym producentem IL-6 była *A. adeninivorans* (210 mg/l). Gen kodujący cytokinę klonowano pod kontrolę promotora *TEF1 A. adeninivorans*, który jest rozpoznawany przez wszystkie badane gatunki drożdży, w wektorze o szerokim zakresie gospodarzy. Sekrecję białka uzyskano dzięki fuzji genu z sekwencją kodującą prepro peptyd α-faktora *S. cerevisiae*. Ponadto, badania wykazały, że tylko w komórkach *A. adeninivorans* prekursor MFα-IL-6 ulegał prawidłowemu proteolitycznemu dojrzewaniu. *H. polymorpha* i *S. cerevisiae* wydzielały natomiast białko nie posiadające ośmiu aminokwasów na N-końcu, z taką samą wydajnością 90 mg/litr pożywki [3].

W Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej skonstruowano wydajny system do produkcji proteinazy *K Tritirachium album* w komórkach *P. pastoris*. Sekwencję kodującą prekursor białka prepro-Lys-Arg-proteinaza K klonowano pod kontrolę indukowanego metanolem promotora *AOX1*. W wyniku biosyntezy i oczyszczania proteinazy K metodą chromatografii oddziaływań hydrofobowych uzyskano 700 mg białka z litra pożywki pohodowlanej.

Zastosowanie rekombinantowych szczepów drożdży nie ogranicza się jedynie do produkcji heterologicznych białek. Rosnące zapotrzebowanie na etanol wykorzystywany jako składnik biopaliw sprawiło, że prowadzone są intensywne badania nad konstrukcją rekombinantowych szczepów *S. cerevisiae* zdolnych do efektywnej produkcji etanolu ze źródeł węgla nie metabolizowanych przez dzikie szczepy, np. laktozy. Cel ten próbowano osiągnąć na drodze klonowania

genów kodujących β-D-galaktozydazę (*LAC4*) i permeazę laktozową *(LAC12*) *Kluyveromyces lactis* w komórkach *S. cerevisiae*. Wektory ekspresyjne zastosowane do konstrukcji rekombinantowych szczepów drożdży zawierały indukowany galaktozą hybrydowy promotor *CYC-GAL*, zmutowany gen *leu2d* jako marker selekcyjny oraz sekwencję rDNA umożliwiającą integrację DNA plazmidowego z genomem *S. cerevisiae*. Uzyskane szczepy rekombinantowe były stabilne genetycznie, zdolne do utylizacji laktozy, jednak ich metabolizm został przesunięty w kierunku tlenowego, charakteryzującego się dużą produkcją biomasy, kosztem fermentacji alkoholowej [35]. Inne badania obejmowały konstrukcję szczepu *S. cerevisiae* zawierającego gen kodujący β-D-galaktozydazę *Aspergillus niger* wraz z własną sekwencją sygnalną, dzięki której enzym był produkowany zewnątrzkomórkowo. Rekombinantowy szczep nie spełniał jednak wymagań procesu fermentacji alkoholowej, ze względu na właściwości biochemiczne enzymu, tj. optymalną temperaturę działania równą 65°C i pH 3,5. Wykazywał on ponadto dwufazowość wzrostu i niestabilność genetyczną. Zaledwie 10% populacji drożdży po procesie fermentacji zachowywała zdolność do produkcji β-D-galaktozydazy *A. niger* [33].

Wydajna produkcja etanolu z hydrolizatów biomasy roślinnej wymaga od stosowanych szczepów drożdży zdolności fermentacji nie tylko heksoz, ale również pentoz, przede wszystkim ksylozy, będących głównym składnikiem frakcji hemicelulozowej drewna czy słomy. Metylotroficzne drożdże *H. polymorpha* wykazują naturalną zdolność fermentacji ksylozy do etanolu, jednak wydajność procesu jest niska. Skonstruowanie rekombinantowego szczepu *H. polymorpha* posiadającego mutacje delecyjne w genach kodujących enzymy katalizujące dwa pierwsze etapy utylizacji ksylozy – NAD(P)H-zależnej reduktazy ksylozowej i dwóch NAD-zależnych dehydrogenaz ksylitolowych oraz niosącego gen izomerazy ksylolowej *E. coli* oraz dodatkowe kopie własnego genu ksylulokinazy pozwoliło natomiast na czterokrotne zwiększenie wydajności produkcji etanolu z ksylozy, jednak nadal jest ona zbyt niska, by proces był ekonomicznie opłacalny [10].

5. Podsumowanie

Drożdżowe systemy ekspresyjne stanowią doskonałe narzędzie do produkcji białek pochodzenia wirusowego, prokariotycznego i eukariotycznego. Dostępnych jest szereg szczepów drożdżowych gospodarzy ekspresyjnych oraz wektorów plazmidowych zawierających sekwencje silnych promotorów transkrypcji, zarówno indukowanych jak i konstytutywnych. Dobrze udokumentowane są również sekwencje sygnalne umożliwiające zewnątrzkomórkową produkcję heterologicznych białek w systemach drożdżowych. Nie ma jednak jednego optymalnego układu do produkcji wszystkich polipeptydów, ponieważ na wydajność biosyntezy oraz poprawność modyfikacji posttranslacyjnych białek wpływ ma zarówno stosowany system, jak i powstający produkt. Dostępność systemów ekspresyjnych opartych nie tylko o *S. cerevisiae*, ale również o gatunki metylotroficznych drożdży *P. pastoris* i *H. polymorpha* oraz dimorficznych drożdży *A. adeninivorans* i *Y. lipolytica*, stwarza jednak możliwość wyboru najlepszego układu do produkcji konkretnego białka. Ponadto, potencjalnie możliwe jest skonstruowanie rekombinantowych szczepów drożdży zdolnych do produkcji metabolitów niebiałkowych, jak alkohole czy kwasy organiczne, z niekonwencjonalnych źródeł węgla, co dodatkowo poszerza zakres przemysłowego zastosowania tych mikroorganizmów.

Piśmiennictwo

1. Avila J., Gonzalez C., Brito N., Siverio J.M.: Clustering of the YNA1 gene encoding a Zn(II)2Cys6 transcriptional factor in the yeast *Hansenula polymorpha* with the nitrate assimilation genes YNT1, YNI1 and YNR1, and its involvement in their transcriptional activation. *Biochem. J.* **335**, 647–652 (1998)
2. Barth G., Gaillardin C.: Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 219–237 (1997)
3. Böer E., Steinborn G., Matros A., Mock H.P., Gellissen G., Kunze G.: Production of interleukin-6 in *Arxula adeninivorans*, *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* by applying the wide-range yeast vector (CoMed™) system to simultaneous comparative assessment. *FEMS Yeast Res*. **7**, 1181–1187 (2007)
4. Cereghino J.L., Cregg J.M.: Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microb. Rev.* **24**, 45–66 (2000)
5. Cereghino G.L., Lim M., Johnson M.A., Cereghino J.L., Sunga A.J., Raghavan D., Gleeson M., Cregg J.M. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene*, **263**, 159–169 (2001)
6. Cox H., Mead D., Sudbery P., Eland M., Evans L.: Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the *PMA1* promoter. *Yeast*, **16**, 1191–1203 (2000)
7. Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y., Madden K.R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell Biol*. **5**, 3376–3385 (1985)
8. Cregg J.M., Shen S., Johnson M., Waterham H.R., Classical genetic manipulation. *Methods Mol. Biol.* **103**, 17–26 (1998)
9. van Dijk R., Faber K.N., Kiel J.A.K.W., Veenhuis M., van der Klei I.: The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. *Enzyme Microb. Technol*. **26**, 793–800 (2000)
10. Dmytruk O.V., Voronovsky A.Y., Abbas C.A., Dmytruk K.V., Ishchuk O.P., Sibirny A.A.: Overexpression of bacterial xy-

lose isomerase and yeast host xyluokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res.* **8**, 165–173 (2008)
11. Gellissen G., Kunze G., Gaillardin C., Cregg J.M., Bererdi E., Veenhuis M., van der Klei I.: New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* – a comparison. *FEMS Yeast Res.* **5**, 1079–1096 (2005)
12. Gienow U., Kunze G., Schauer F., Bode R., Hofemeister J.: The yeast genus *Trichosporon* sp. LS3; Molecular characterization of genomic complexity. *Zbl. Mikrobiol.* **145**, 3–12 (1990)
13. Gleeson M.A.G., White C.E., Meininger D.P., Komives E.A.: Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. *Methods Mol. Biol*. **103**, 81–94 (1998)
14. Harford N., Cabezon T., Colau B., Delisse A.-M., Rutgers T., De Wilde M.: Construction and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain (RIT4376) expressing hepatitis B surface antigen. *Postgrad. Med. J*. **63**, 65–70 (1987)
15. Heo J.H., Hong W.K., Cho E.Y., Kim M.W., Kim J.Y., Kim C.H., Rhee S.K., Kang H.A.: Properties of the *Hansenula polymorpha*-derived constitutive *GAP* promoter, assessed using an *HSA* reporter gene. *FEMS Yeast Res.* **4**, 175–184 (2003)
16. Hodkins M., Mead D., Balance D.J., Goodey A., Sudbery P.: Expression of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* in *Hansenula polymorpha* and its use as reporter gene to isolate regulatory mutants. *Yeast*, **9**, 625–635 (1993)
17. Hollenberg C.P., Gellissen G.: Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol*. **8**, 554–560 (1997)
18. Janowicz Z.A., Melber K., Merckelbach A., Jacobs E., Harford N., Comberbach M., Hollenberg C.P.: Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, **7**, 431–433 (1991)
19. Juretzek T., Wang H.J., Nicaud J.M., Mauersberger S., Barth G.: Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of β-galactosidase in the alkane-utylizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **5**, 320–326 (2000)
20. Klabunde J., Kleebank S., Piontek M., Hollenberg C.P., Hellwig S., Degelmann A.: Increase of calnexin gene dosage boosts the secretion of heterologous proteins by *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res*. **7**, 1168–1180 (2007)
21. Le Dall M.-T., Nicaud J.-M., Gaillardin C.: Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet*. **26**, 38–44 (1994)
22. Levine D.W., Cooney C.L.: Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. *Appl. Microbiol*. **26**, 982–989 (1973)
23. Madzak C., Treton B., Blanchin-Roland S.: Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 207–216 (2000)
24. Mayer A.F., Hellmuth K., Schlieker H., Lopez-Ulibarri R., Oertel S., Dahlems U., Strasser A.W.M., van Loon A.P.G.M.: An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 373–381 (1999)
25. Middelhoven W.J., Hoogkamerte Niet M.C., Kregervan Rij N.J.W.: *Trichosporon adeninivorans* sp. nov., a yeast species utilizing adenine, xanthine, uric acid, putrescine and primary n-alkylamines as sole source of carbon, nitrogen and energy. *Anton. Leeuwenhoek*, **50**, 369–378 (1984)
26. Middelhoven W.J., de Jong I.M., de Winter M.: *Arxula adeninivorans*, a yeast assimilating many nitrogenous and aromatic compounds. *Anton. Leeuwenhoek*, **60**, 129–137 (1991)
27. Nicaud J.-M., Fabre E., Gaillardin C.: Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr. Genet.* **16,** 253–260 (1989)
28. Nicaud J.-M., Madzak C., van den Broek P., Gysler C., Duboc P., Niederberger P., Gaillardin C.: Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*. **2**, 371–379 (2002)
29. Ogrydziak D.M., Demain A.L., Tannenbaum R.S.: Regulation of extracellular protease production in *Candida lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 525–538 (1977)
30. Park C.S., Chang C.C., Ryu D.D.Y.: Expression and high-level secretion of *Trichoderma reesei* endoglucanase I in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **87**, 1–15 (2000)
31. Phongdara A., Merckelbach A., Keup P., Gellissen G., Hollenberg C.P.: Cloning and characterization of the gene encoding a repressible acid phosphatase (*PHO1*) from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **50**, 77–84 (1998)
32. Pignède G., Wang H., Fudalej F., Seman M., Gaillardin C., Nicaud J.-M.: Autocloning and amplification of *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3283–3289 (2000)
33. Ramakrishnan S., Hartley B.S.: Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4230–4235 (1993)
34. Roggenkamp R., Hansen H., Eckart M., Janowicz Z., Hollenberg C.P.: Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replicating and integrating vectors. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 302–308 (1986)
35. Rubio-Texeira M., Castrillo J.I., Adam A.C., Ugalde U.O., Polaina J.: Highly efficient assimilation of lactose by a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 827–837 (1998)
36. Sears I.B., O'Connor J., Rossanese O.W., Glick B.S.: A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast,* **14**, 783–790 (1998)
37. Shen S., Sulter G., Jeffries T.W., Cregg J.M.: A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes the yeast *Pichia pastoris*. *Gene,* **216**, 93–102 (1998)
38. Steinborn G., Gellissen G., Kunze G.: Assessment of *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*-derived rDNA-targeting elements fort he design of *Arxula adeninivorans* expression vectors. *FEMS Yeast Res*. **5**, 1047–1054 (2005)
39. Steinborn G., Wartmann T., Gellissen G., Kunze G.: Construction of an *Arxula adeninivorans* host-vector system based on *trp1* complementation. *J. Biotechnol*. **127**, 392–401 (2007)
40. Steinborn G., Gellissen G., Kunze G.: A novel vector element providing multicopy vector integration in *Arxula adeninivorans*. *FEMS Yeast Res*. **7**, 1197–1205 (2007)
41. Tschopp J.F., Brust P.F., Cregg J.M., Stillman C.A., Gingeras T.R.: Expression of the *LacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res*. **15**, 3859–3876 (1987)

42. Tschopp J.F., Sverlow G., Kosson R., Craig W., Grinna L.: High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, **5**, 1305–1308 (1987)
43. Vernis L., Abbas A., Chasles M., Gaillardin C., Brun C., Huberman J.A., Fournier P.: An origin of replication and a centromere are both needed to establish a replicative plasmid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell Biol*. **17**, 1995–2004 (1997)
44. Wartmann T., Krüger A., Adler K., Bui M.D., Kunze I., Kunze G.: Temperature dependent dimorphism of the yeast *Arxula adeninivorans* LS3. *Anton. Leeuwenhoeck*, **68**, 215–223 (1995)
45. Wartmann T., Erdmann J., Kunze I., Kunze G.: Morphology-related effects on gene expression and protein accumulation of the yeast *Arxula adeninivorans* LS3. *Arch. Microbiol*. **173**, 253–261 (2000)
46. Wartmann T., Böer E., Huarto Pico A., Sieber H., Bartelsen O., Gellissen G., Kunze G.: Hig-level production and secretion of recombinant proteins by the dimorphic yeast *Arxula adeninivorans*. *FEMS Yeast Res*. **2**, 363–369 (2002)
47. Waterham H.R., Digan M.E., Koutz P.J., Lair S.V., Cregg J.M.: Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promotor. *Gene*, **186**, 37–44 (1997)
48. Weydemann U., Keup P., Piontek M., Strasser A.W.M., Schweden J., Gellissen G., Janowicz S.A.: High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha*-authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 377–385 (1995)
49. Zwart K.B., Veenhuis M., Harder W.: Characterization of glyoxysomes in yeasts and their transformation into peroxisomes in response to changes in the environmental conditions. *Arch. Microbiol.* **136**, 28–38 (1983)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 257–262
http://www.pm.microbiology.pl

LUDZKI KORONAWIRUS NL63 – OBRAZ KLINICZNY I CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Krzysztof Pyrć

Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, tel. kom. 692 696 863, e-mail: k.a.pyrc@gmail.com

1. Identyfikacja ludzkiego koronawirusa NL63. 2. Receptor komórkowy. 3. Epidemiologia. 4. Obraz kliniczny infekcji. 5. Terapia. 6. Podsumowanie

Human Coronavirus NL63 – molecular characteristics and clinical image

Abstract: The first two human coronaviruses: 229E and OC43 were identified as human respiratory pathogens already in the 1960's. For almost 40 years – until the emergence of the SARS-CoV – these viruses have been neglected and remained in the shadow of more pathogenic viral species. The emergence of a highly virulent coronavirus resulted in the increased interest in this group of viruses, and soon after two more coronaviral species infecting humans were identified: HCoV-NL63 and HCoV-HKU1. The following manuscript summarizes the current knowledge about the new human pathogen – human coronavirus NL63.

1. Identification of human coronavirus NL63. 2. Cellular receptor 3. Epidemiology. 4. Clinical presentation 5. Therapy. 6. Summary

Słowa kluczowe: HCoV-NL63, koronawirus, choroby układu oddechowego, krup
Key words: HCoV-NL63, coronavirus, respiratory illness, croup

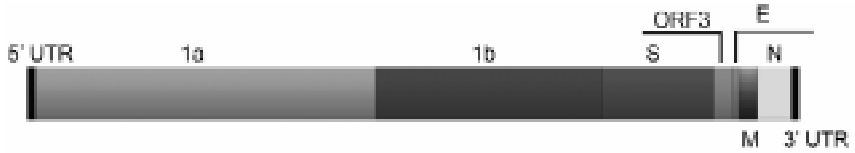
1. Identyfikacja ludzkiego koronawirusa NL63

W styczniu 2003 roku, 7 miesięczne dziecko zostało przyjęte do szpitala w Amsterdamie, z gorączką, objawami choroby układu oddechowego oraz zapaleniem spojówek. Badania kliniczne wykazały typowe objawy zapalenia oskrzeli i oskrzelików. Próbka kliniczna z jamy nosowej pacjenta została pobrana 5 dni po pojawieniu się pierwszych objawów chorobowych. Testy diagnostyczne wykluczyły bakteryjne podłoże infekcji i nie wykazały obecności znanych patogenów wirusowych związanych z chorobami układu oddechowego (wirus RS, adenowirus, wirusy grypy A i B, rinowirus, enterowirus oraz koronawirusy).

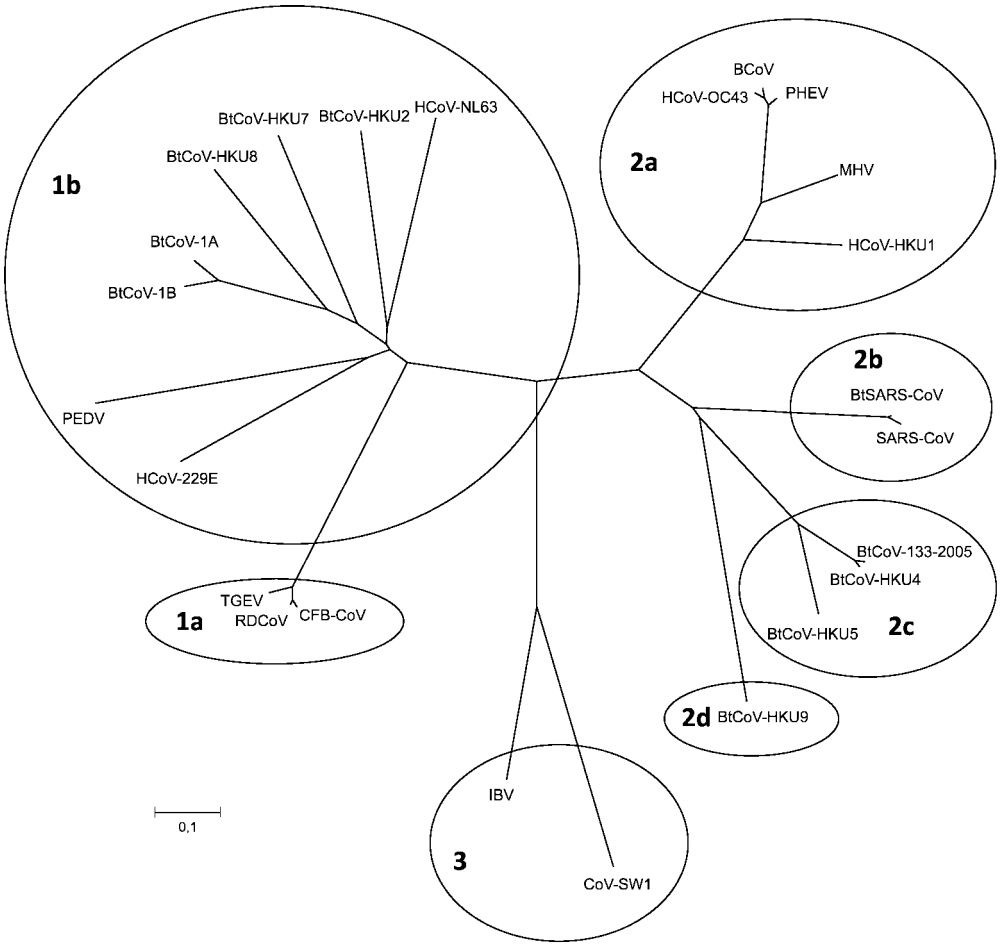
Inokulacja hodowli komórkowych materiałem klinicznym (pierwotne ludzkie płodowe fibroblasty płucne (HEL), trzeciorzędowe komórki epitelialne z małpiej nerki (tMK) oraz linie komórkowa HeLa) spowodowała po 8 dniach od inokulacji objawy infekcji oraz postępującą śmierć komórek w hodowli komórek tMK. Podobny efekt pojawił się również przy reinfekcji linii komórkowej LLC-MK2 (transformowane komórki epitelialne z małpiej nerki). Aby zidentyfikować nieznany patogen, wykorzystano nową metodę VIDISCA (Virus Discovery based on cDNA-AFLP). Stwierdzono, że obecny w próbce patogen jest nieznanym wcześniej wirusem – ludzkim koronawirusem NL63 (HCoV-NL63) [28, 29, 38].

Sekwencjonowanie genomu wirusa pozwoliło na przeprowadzenie szczegółowej analizy filogenetycznej. Uzyskane wyniki potwierdziły, że stanowi on odrębny gatunek przynależący do rodziny *Coronaviridae* (rys. 1). Genom HCoV-NL63 o długości 27 553 nukleotydów posiada organizację typową dla rodziny *Coronaviridae* (rys. 2) [29, 31, 32]. Najwyższe podobieństwo na poziomie sekwencji nukleotydowej zostało stwierdzone w stosunku do ludzkiego koronawirusa 229E i wynosi 65%. Późniejsza identyfikacja licznych wariantów HCoV-NL63, z wieloma charakterystycznymi cechami specyficznymi, podkreśla fakt, że wirus ten nie został wprowadzony do populacji w ostatnim czasie. Grupowanie się wariantów molekularnych nie jest związane z dystrybucją geograficzną, jako że z badań jasno wynika, że różne warianty koegzystują na tym samym terytorium, wykazując cechy rekombinantów wewnątrzgatunkowych [31].

W krótkim czasie, inna holenderska grupa badawcza potwierdziła odkrycie HCoV-NL63. Drugi raport opisuje identyfikację wirusa NL63 w próbce pochodzącej z wymazu z nosa, zebranego w roku 1988 od



Rys. 1. Mapa filogenetyczna rodziny *Coronaviridae*. W analizie wykorzystano sekwencje genu N.
Drzewo zostało sporządzone metodą Neighbor-joining z wykorzystaniem dwu-parametrycznego modelu Kimury.



Rys. 2. Organizacja genomu koronawirusa NL63.

Geny odpowiedzialne za kodowanie białek niestrukturalnych (m.in. proteazy, polimeraza, helikaza i.in.) mieszczą się w dwóch ramkach odczytu 1a i 1b, zajmując 2/3 genomu; białka strukturalne (S-Spike, ORF-3, E-envelope, M-membrane, N-nucleocapsid) zajmują pozostałą część genomu bliżej końca 3'.

8-miesięcznego chłopca cierpiącego na zapalenie płuc. Hodowla komórkowa, podobnie jak w przypadku pierwszego manuskryptu, pokazała, że wirus wydajnie replikuje w komórkach tMK, wywołując zmiany cytopatologiczne po 7 dniach od inokulacji. Ponadto, badania wykazały, że wirus replikuje również na komórkach Vero E6 (linia epitelialnych komórek z małpiej nerki). Badanie próbki pochodzącej z hodowli komórkowej pod mikroskopem elektronowym wykazało obecność wirusów o średnicy ~140 nm i charakterystycznym dla koronawirusów kształcie. Losowa amplifikacja metodą RAP-PCR i późniejsze sekwencjonowanie, potwierdziły, że poszukiwany patogen jest koronawirusem NL63 (izolat NL) [3].

Rok po ukazaniu się obu prac, grupa J. K a h n opisała identyfikację tego samego wirusa (94–100% podobieństwa na poziomie nukleotydów), nadając mu nową nazwę: koronawirus New Haven (NH) [11]. Po tym wydarzeniu, Międzynarodowa Komisja do spraw Taksonomii Wirusów zatwierdziła pierwszą nazwę koronawirus NL63, jako prawidłową, obejmującą wszystkie szczepy, w tym NL oraz NH.

2. Receptor komórkowy

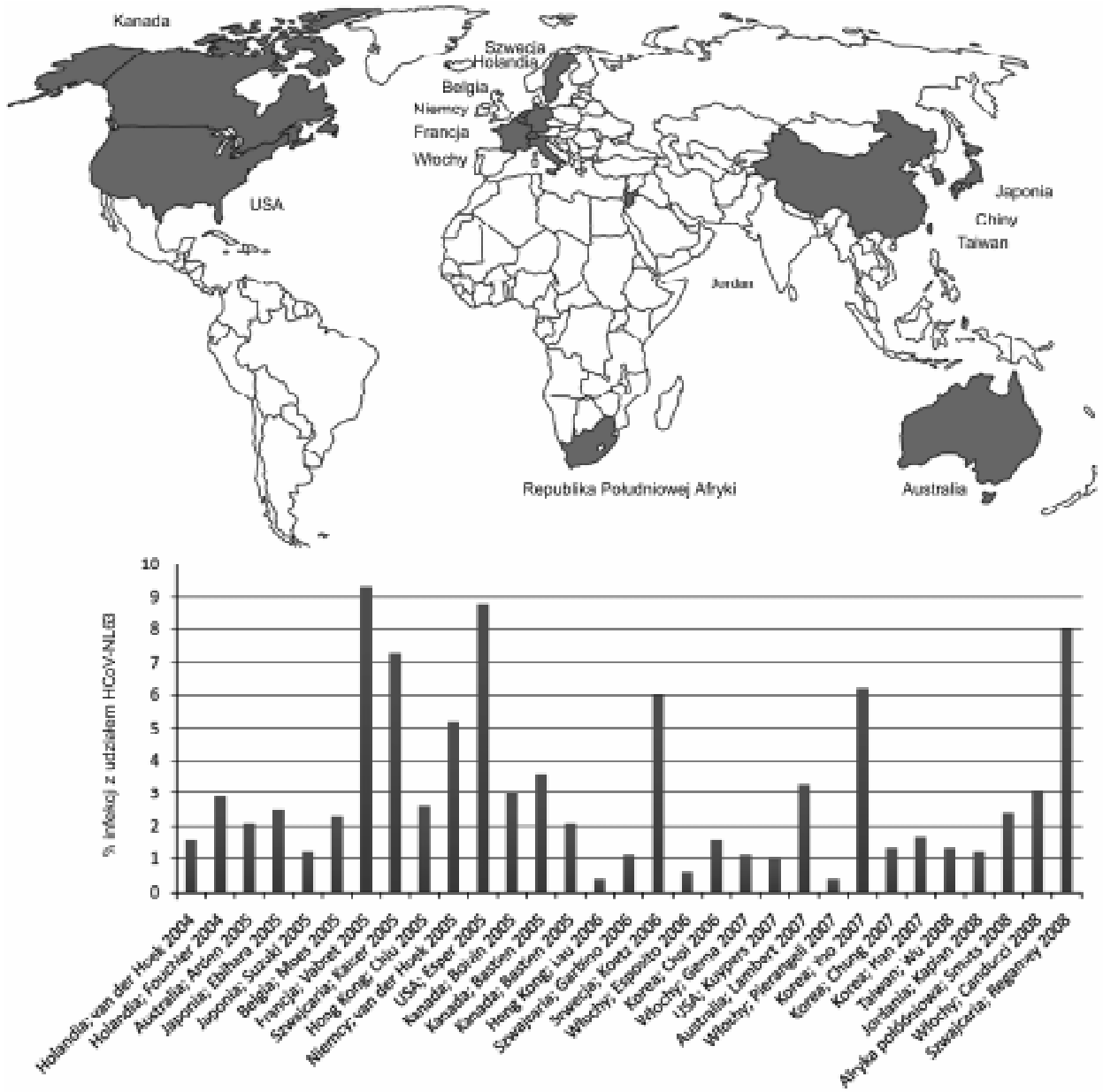
Przyłączenie się koronawirusa do komórki infekowanej, następuje poprzez wiązanie białka fuzyjnego S z receptorem na błonie komórkowej. Białko S koronawirusa NL63 jest białkiem fuzyjnym klasy I. N-końcowa domena białka (S1) zawiera region odpowiedzialny za interakcje z receptorem komórkowym, podczas gdy część C-końcowa jest zakotwiczona w błonie komórkowej i zawiera dwa regiony HR (heptad repeat) oraz peptyd fuzyjny, niezbędne w procesie fuzji błony wirusowej z błon komórkową.

Białko CD13 (aminopeptydaza N) było uznawane przez wiele lat za receptor komórkowym dla wszystkich koronawirusów grupy I [9, 36, 42], jednakże dane uzyskane w badaniach dotyczących tropizmu HCoV-NL63 wskazały na odmienny mechanizm wejścia wirusa do komórki infekowanej [17, 38]. Badania wykazały, że koronawirus NL63, jako jedyny z rodziny *Coronaviridae* oprócz SARS-CoV, wykorzystuje enzym konwertujący angiotensynę 2 (angiotensin converting enzyme 2; ACE2), która występuje m.in. na ko-

mórkach nabłonka zarówno górnych jak i dolnych dróg oddechowych [17]. Białko ACE2 jest jednym z kluczowych enzymów szlaku reninowo-angiotensynowego. Jego homolog – białko ACE enzymatycznie trawi angiotensynę I, zmieniając ją w angiotensynę II, podczas kiedy ACE2 inaktywuje angiotensynę II, zapewniając stan równowagi. I m a i i wsp. postawili hipotezę, że akumulacja angiotensyny II związana z obniżonym poziomem ACE2 w czasie infekcji wirusem SARS-CoV jest powiązana z poważnym uszkodzeniem płuc w czasie infekcji [18, 22]. Teorii tej przeczą dane uzyskane dla koronawirusa NL63. Infekcja wirusem NL63 wydaje się powodować podobne obniżenie poziomu białka ACE2 w zakażonych komórkach co infekcja wirusem SARS-CoV, pomimo że objawy kliniczne zakażenia tymi wirusami różnią się diametralnie (badania własne nieopublikowane).

3. Epidemiologia

Pierwsze prace nad HCoV-NL63 pokazały, że patogen ten nie jest endemiczny i występuje na całym świecie. HCoV-NL63 jest odpowiedzialny za 1–10% wszystkich zakażeń układu oddechowego w skali roku (rys. 3), występując znacznie częściej w okresie zimy i wczesnej wiosny [2–3, 10, 26, 37, 39].



Rys. 3. Epidemiologia a) Dystrybucja zakażeń wirusem HCoV-NL63 na świecie.

Kraje, w których zidentyfikowano pacjentów cierpiących na infekcje HCoV-NL63 są zaznaczone kolorem czerwonym. Białe regiony rep rezentują kraje, w których nie przeprowadzono badań b) Częstość występowania ludzkiego koronawirusa NL63 wśród pacjentów cierpiących na i nfekcje układu oddechowego w różnych krajach [1–8, 10–16, 19–21, 23–27, 33–35, 37–40, 43].

Z badań próbek klinicznych wynika, że przy infekcji wirusem HCoV-NL63 często spotyka się również infekcję drugim wirusem układu oddechowego (częstość superinfekcji ~50%) [39]. Infekcje podwójne są częstsze u pacjentów hospitalizowanych, niż u pacjentów leczonych ambulatoryjnie sugerując, że podwójna infekcja ma ostrzejszy przebieg niż zakażenie spowodowane tylko korona wirusem NL63 [6, 39]. Interesujący jest fakt, że ilość kopii koronawirusa NL63 w przypadku koinfekcji jest znacznie niższa niż przy infekcjach pojedynczych. Może to być spowodowane wieloma czynnikami, m.in. kompetycją wirusów o komórki, które mogą ulec zakażaniu lub odpowiedzią immunologiczną wywołaną przez drugi wirus. Inna możliwość zakłada, że w momencie superinfekcji drugim wirusem, infekcja HCoV-NL63 jest już zahamowana przez układ immunologiczny. Sugerowałoby to zwiększenie predyspozycji do infekcji wirusami układu oddechowego poprzez infekcję koronawirusem NL63.

4. Obraz kliniczny infekcji

Pierwsze opisane przypadki infekcji koronawirusem NL63 dotyczyły dzieci cierpiących na poważne infekcje dolnych dróg oddechowych sugerując powiązanie infekcji wirusowej z poważnymi symptomami klinicznymi [13, 38]. Fakt, że jeden z pacjentów zmarł w 5. dniu po wystąpieniu objawów, dodatkowo wskazuje na potencjalnie ciężki przebieg infekcji [2].

Wszystkie wyniki uzyskane do tej pory wskazują na fakt, że HCoV-NL63 podobnie jak pozostałe znane ludzkie koronawirusy (229E oraz OC43) może powodować choroby układu oddechowego, głównie opisywane jako przeziębienia. Obserwacja ta jest potwierdzona również statystykami pokazującymi, że wirus jest najczęściej wykrywany u pacjentów leczonych ambulatoryjnie, znacznie rzadziej wywołuje infekcję prowadzącą do hospitalizacji. W niektórych jednak przypadkach, HCoV-NL63 może powodować poważaną chorobę o ostrym przebiegu u dzieci, osób starszych oraz osób o obniżonym poziomie odporności [1–8, 10–16, 19–21, 23–27, 33–35, 37–40, 43].

Badania przeprowadzone na terytorium Niemiec (PRI-DE) jasno wykazały istnienie silnej zależności pomiędzy infekcją HCoV-NL63 a występowaniem krupu u dzieci. Prawie połowa dzieci zakażonych wirusem NL63 wykazywała objawy krupu [39]. Z drugiej strony, badania innych grup nie wykazują podobnej zależności. Ta niezgodność może by związana z faktem, że pacjenci z krupem bardzo rzadko podlegają hospitalizacji i jeszcze rzadziej są diagnozowani w kierunku obecności wirusów układu oddechowego, a co za tym idzie, są grupą często pomijaną w badaniach. Badania populacyjne pozwalają na identyfikację podobnych zależności i eliminację czynników zaburzających. Częstość występowania krupu przy infekcji HCoV-NL63 wynosiła dla badań z Niemiec: 43%, Hong Kongu: 27%, Taiwanu: 43,4%, Korei: 64,2% [6, 16, 39, 40].

5. Terapia

W przypadku pacjentów hospitalizowanych, niezbędna może być substancja czynna, ograniczająca replikację koronawirusa NL63, pozwalająca zatrzymać rozwój choroby. Wiele inhibitorów zostało opisanych jako leki skutecznie hamujące replikację koronawirusów, w tym HCoV-NL63. Substancje te działają w różnych stadiach replikacji patogenu, przykładowo – interferują z wiązaniem receptora, fuzją z błoną komórkową, transkrypcją lub też z obróbką post-translacyjną [30].

Unikalność proteaz koronawirusowych oraz ich funkcja w trakcie posttranslacyjnej obróbki białek wirusa sprawia, że są one doskonałym celem dla substancji terapeutycznych. Yang i wsp. zaprojektowali serię inhibitorów protezy M^{pro}, spośród których substancja N3 wykazywała silne właściwości przeciwkoronawirusowe, również w stosunku do HCoV-NL63 [41]. Innym ciekawym inhibiotorem mogą być syntetyczne peptydy HR, interferujace ze zmianami strukturalnymi w obrębie białka S odpowiającego za fuzję z komórką gospodarza. Skuteczność podobnego podejścia została już wcześniej udowodniona dla licznych rodzin wirusowych (np.: retrowirusy, paramyksowirusy czy inne koronawirusy). Innym podejściem jest zastosowanie wyciszania ekspersji genu S HCoV-NL63 przy pomocy siRNA [30].

Zastosowanie analogów nukleozydów (*b*-D-N4-hydroxycytydna oraz 6-azaurydyna) posiada również pewien potencjał, jednak ze względu na wysoką toksyczność zastosowanie ich w warunkach klinicznych może być utrudnione [30].

6. Podsumowanie

Ludzki koronawirus NL63 został po raz pierwszy opisany w 2004 roku, jednak bardzo szybko okazało się, że był on obecny w populacji ludzkiej od wielu lat [31]. Najstarszy izolat kliniczny, w którym stwierdzono obecność HCoV-NL63 pochodzi z 1988 roku, natomiast datowanie metodą zegara molekularnego sugeruje, że rozdzielenie się gatunków HCoV-NL63 oraz HCoV-229E zaszło w XI wieku naszej ery [31]. Prawdopodobnie wirus nie został zidentyfikowany wcześniej ze względu na niedoskonałe metody diagnostyczne i trudności natury technicznej. Możliwe jest

natomiast, że liczne izolaty kliniczne koronawirusów uzyskane w latach sześćdziesiątych i osiemdziesiątych reprezentowały właśnie ludzkiego koronawirusa NL63.

Dwa pierwsze raporty dotyczące infekcji wirusem NL63 pochodziły z Holandii. W bardzo krótkim czasie liczne grupy badawcze z całego świata ogłosiły wykrycie wirusa u pacjentów cierpiących na choroby układu oddechowego. Częstość występowania w wszystkich badaniach oscyluje na poziomie 1–10% wszystkich osób cierpiących na choroby układu oddechowego [1–8, 10–16, 19–21, 23–27, 33–35, 37–40, 43]. Infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych obserwowane w czasie infekcji koronawirusem NL63, przypominają w dużym stopniu objawy kliniczne zakażenia koronawirusami OC43 oraz 229E. Wyniki wielu badań wykazały, że wirusy te u ludzi dorosłych mogą wywoływać krótkie infekcje o relatywnie łagodnym przebiegu, ale u dzieci, osób starszych i osób z obniżonym poziomem odporności mogą wywoływać znacznie poważniejsze infekcje wymagające hospitalizacji. Jednym z czynników różnicujących te gatunki jest związek infekcji HCoV-NL63 z krupem u dzieci [6, 16, 39, 40].

Piśmiennictwo

1. Arden K.E., Nissen M.D., Sloots T.P., Mackay I.M.: New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J. Med. Virol.* **75**, 455–462 (2005)
2. Bastien N., Anderson K., Hart L., Van Caeseele P., Brandt K., Milley D., Hatchette T., Weiss E.C., Li Y.: Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J. Infect. Dis.* **191**, 503–506 (2005)
3. Bastien N., Robinson J.L., Tse A., Lee B.E., Hart L., Li Y.: Human coronavirus NL-63 infections in children: a 1-year study. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4567–4573 (2005)
4. Boivin G., Baz M., Cote S., Gilca R., Deffrasnes C., Leblanc E., Bergeron M.G., Dery P., De Serres G.: Infections by human coronavirus-NL in hospitalized children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 1045–1048 (2005)
5. Canducci F., Debiaggi M., Sampaolo M., Marinozzi M.C., Berre S., Terulla C., Gargantini G., Cambieri P., Romero., Clementi M.: Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J. Med. Virol.* **80**, 716–723 (2008)
6. Chiu S. S., Chan K. H., Chu K. W., Kwan S. W., Guan Y., Poon L.L., Peiris J.S.: Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1721–1729 (2005)
7. Choi E.H., Sung I.Y. i wsp.: The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000–2005. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 585–592 (2006) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
8. Chung J.Y., Han T.H., Kim S.W., Kim C.K., Hwang E.S.: Detection of viruses identified recently in children with acute wheezing. *J. Med. Virol.* **79**, 1238–1243 (2007)
9. Delmas B., Gelfi J., L'Haridon R., Vogel L.K., Sjostrom H., Noren O., Laude H.: Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, **357**, 417–420 (1992)
10. Ebihara T., Endo R., Ma X., Ishiguro N., Kikuta H.: Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *J. Med. Virol.* **75**, 463–465 (2005)
11. Esper F., Weibel C., Ferguson D., Landry M.L., Kahn J.S.: Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J. Infect. Dis.* **191**, 492–498 (2005)
12. Esposito S., Bosis S., Niesters H. G., Tremolati E., Begliatti E., Rognoni A., Tagliabue C., Principi N., Osterhaus A.D.: Impact of human coronavirus infections in otherwise healthy children who attended an emergency department. *J. Med. Virol.* **78**, 1609–1615 (2006)
13. Fouchier R.A., Hartwig N.G., Bestebroer T.M., Niemeyer B., de Jong J. C., Simon J. H., Osterhaus A.D.: A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6212–6216 (2004)
14. Garbino J., Crespo S., Aubert J.D, Rochat T., Ninet B. Deffernez C., Wunderli W., Pache J.C., Soccal P.M., Kaiser L.: A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (Non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1009–1015 (2006)
15. Gerna G., Percivalle E., Sarasini A., Campanini G., Piralla A., Rovida F., Genini E., Marchi A., Baldanti F.: Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. *J. Clin. Virol.* **38**, 244–250 (2007)
16. Han T.H., Chung J.Y., Kim S.W., Hwang E.S.: Human Coronavirus-NL63 infections in Korean children, 2004–2006. *J. Clin. Virol.* **38**, 27–31 (2007)
17. Hofmann H., Pyrc K., van der Hoek L., Geier M., Berkhout B., Pohlmann S.: Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7988–7993 (2005)
18. Imai Y., Penninger J.M. i wsp.: Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, **436**, 112–116 (2005) (cytowana praca jest dziełem 18 autorów)
19. Kaiser L., Regamey N., Roiha H., Deffernez C., Frey U.: Human coronavirus NL63 associated with lower respiratory tract symptoms in early life. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 1015–1017 (2005)
20. Kaplan N.M., Dove W., Abd-Eldayem S.A., Abu-Zeid A.F., Shamoon H.E., Hart C.A.: Molecular epidemiology and disease severity of respiratory syncytial virus in relation to other potential pathogens in children hospitalized with acute respiratory infection in Jordan. *J. Med. Virol.* **80**, 168–174 (2008)
21. Koetz A., Nilsson P., Linden M., van der Hoek L., Ripa T.: Detection of human coronavirus NL63, human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in children with respiratory tract infections in south-west Sweden. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 1089–1096 (2006)
22. Kuba K., Penninger J.M. i wsp.: A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11**, 875–879 (2005) (cytowana praca jest dziełem 24 autorów)
23. Kuypers J., Martin E.T., Heugel J., Wright N., Morrow R., Englund J.A.: Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics*, **119**, e70–e76 (2007)
24. Lambert S.B., Allen K.M., Druce J.D., Birch C.J., Mackay I.M., Carlin J.B., Carapetis J.R., Sloots T.P., Nissen M.D., Nolan T.M.: Community epidemiology of human metapneumovirus,

human coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens. *Pediatrics*, **120**, e929–e937 (2007)
25. Lau S.K., Yuen K. i wsp.: Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2063–2071 (2006) (cytowana praca jest dziełem 15 autorów)
26. Moes E., Vijgen L. Keyaerts E., Zlateva K., Li S., Maes P., Pyrc K., Berkhout B., van der Hoek L., Van Ranst M.: A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC. Infect. Dis.* **5**, 6 (2005)
27. Pierangeli A., Antonelli G. i wsp.: Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J. Med. Virol.* **79**, 463–468 (2007) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
28. Pyrc K., Berkhout B., van der Hoek L.: Identification of new human coronaviruses. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **5**, 245–253 (2007)
29. Pyrc K., Berkhout B., van der Hoek L.: The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J. Virol.* **81**, 3051–3057 (2007)
30. Pyrc K., Bosch B. J., Berkhout B., Jebbink M. F., Dijkman R., Rottier P., van der Hoek L.: Inhibition of human coronavirus NL63 infection at early stages of the replication cycle. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2000–2008 (2006)
31. Pyrc K., Dijkman R., Deng L., Jebbink M.F., Ross H.A., Berkhout B., van der Hoek L.: Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *J. Mol. Biol.* **364**, 964–973 (2006)
32. Pyrc K., Jebbink M.F., Berkhout B., van der Hoek L.: Genome structure and transcriptional regulation of human coronavirus NL63. *Virol. J.* **1**, 7 (2004)
33. Regamey N., Kaiser L., Roiha H.L., Deffernez C., Kuehni C.E., Latzin P., Aebi C., Frey U.: Viral etiology of acute respiratory infections with cough in infancy: a community-based birth cohort study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**, 100–105 (2008)
34. Smuts H., Workman L., Zar H.J.: Role of human metapneumovirus, human coronavirus NL63 and human bocavirus in infants and young children with acute wheezing. *J. Med. Virol.* **80**, 906–912 (2008)
35. Suzuki A., Okamoto M., Ohmi A., Watanabe O., Miyabayashi S., Nishimura H.: Detection of human coronavirus-NL63 in children in Japan. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 645–646 (2005)
36. Tresnan D.B., Levis R., Holmes K.V.: Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J. Virol.* **70**, 8669–8674 (1996)
37. Vabret A., Mourez T., Dina J., van der Hoek L., Gouarin S., Petitjean J., Brouard J., Freymuth F.: Human coronavirus NL63, France. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1225–1229 (2005)
38. van der Hoek L., Pyrc K., Jebbink M.F., Vermeulen-Ost W., Berkhout R.J., Wolthers K.C., Wertheim-van Dillen P.M., Kaandorp J., Spaargasen J., Berkhout B: Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 368–373 (2004)
39. van der Hoek L., Sure K. Ihorst G., Stang A., Pyrc K., Jebbink M.F., Petersen G., Forster J., Berkhout B., Uberla K.: Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS. Med.* **2**, e240 (2005)
40. Wu P.S., Huang L.M. i wsp.: Clinical manifestations of human coronavirus NL63 infection in children in Taiwan. *Eur. J. Pediatr.* **167**, 75–80 (2008) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
41. Yang H., Rao Z. i wsp.: Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases. *PLoS. Biol.* **3**, e324 (2005) (cytowana praca jest dziełem 19 autorów)
42. Yeager C.L., Ashmun R.A., Williams R.K., Cardellichio C.B., Shapiro L.H., Look A.T., Holmes K.V.: Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, **357**, 420–422 (1992)
43. Yoo S.J., Kuak E.Y., Shin B.M.: Detection of 12 respiratory viruses with two-set multiplex reverse transcriptase-PCR assay using a dual priming oligonucleotide system. *Korean J. Lab. Med.* **27**, 420–427 (2007)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 263–266
http://www.pm.microbiology.pl

WIRUSY JAKO BROŃ BIOLOGICZNA

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Andrzej Denys*, Monika Bigos

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Sanitarnej Katedry Mikrobiologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Pl. Hallera 1, 90-647 Łódź, tel. (42) 633 84 66
* Autor korespondencyjny: e-mail: denys@achilles.wam.lodz.pl

1. Wprowadzenie. 2. Wirusy jako broń biologiczna. 3. Profilaktyka. 4. Podsumowanie

Viruses as biological weapons

Abstract: As the threat of bioterrorism seems to be more and more likely, the possibility of using microorganisms, including pathogens of people and animals and their toxins in a bioterrorist attack is of great concern. The use of genetically modified microorganisms, e.g. with the increased affinity to traget structures or higher resistance to chemotherapeutics and external factors such as dryness or temperature, as agents of bioterrorism should be taken into consideration. This article characterizes viruses that might be used as biological weapons, especially poxviruses and haemorrhagic fever viruses.

1. Introduction. 2. Viruses as biological weapons. 3. Prophylaxis. Summary

Słowa kluczowe: bioterroryzm, broń biologiczna, wirusy
Key words: bioterrorism, biological weapon, viruses

1. Wprowadzenie

Późną wiosną 1925 roku w Genewie odbyła się międzynarodowa konferencja poświęcona kontroli nad handlem bronią i sprzętem wojskowym. Spotkanie zorganizowano w reakcji na szok wywołany przerażającymi skutkami wykorzystania broni chemicznej po I Wojnie Światowej. Jednym z zasadniczych osiągnięć było przyjęcie tzw. Protokołu Genewskiego, zakazującego stosowania broni chemicznej. Dzięki zdecydowanemu działaniu delegacji polskiej pod przewodnictwem generała Kazimierza Sosnkowskiego, uczestnicy konferencji przyjęli także zapis o zakazie stosowania broni bakteriologicznej. Protokół Genewski jest nadal obowiązującym aktem prawnym podpisanym przez 125 państw. Sytuacja w zakresie rozprzestrzeniania broni biologicznej, zwłaszcza w obliczu narastającego zagrożenia terroryzmem międzynarodowym, jest jednak nadal niepewna, mimo iż od czasu genewskiej konferencji minęły 83 lata. Dlatego ówczesne wezwanie generała Sosnkowskiego, by w imię cywilizacji nie dopuścić do wykorzystania bakteriologii, (ale także wirusologii – przyp. Autorów) do celów barbarzyńskich, pozostaje jak najbardziej aktualne [5].

Zainteresowanie możliwością użycia drobnoustrojów i ich toksyn jako broni biologicznej dotyczy głównie: *Bacillus anthracis*, *Pasteurella pestis*, *Francisella tularensis*, *Clostridium botulinum*, *Poxvirus variolae* i wirusów gorączek krwotocznych. W przypadku ataku biologicznego mogą one poważnie zagrozić bezpieczeństwu narodowemu i dlatego zaliczane są do kategorii A patogenów ludzkich i toksyn zestawionych przez Centres for Diseases Control and Prevention (CDC). Kategoria B obejmuje drobnoustroje o średnim tempie transmisji, dających stosunkowo niewysoki odsetek śmiertelności. Są to bakterie: *Rickettsiae*, *Staphylococcus aureus* wytwarzający enterotoksynę B, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, a także *Cryptosporidium parvum*. Do kategorii C zaklasyfikowano natomiast *Mycobacterium tuberculosis* oraz wirusy Nipah, Hantaan i wirusy żółtej febry. Patogeny należące do dwóch ostatnich grup przenoszone są drogą kropelkową i poprzez zakażoną żywność i wodę [4].

Należy podkreślić, iż istnieje ryzyko użycia jako broni biologicznej szczepów genetycznie modyfikowanych, np. o zwiększonym powinowactwie do struktur docelowych, wyjątkowej oporności na chemioterapeutyki i czynniki zewnętrzne (temperatura, niska wilgotność).

W roku 1972 Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) przyjęła Konwencję o Zakazie Produkcji Broni Biologicznej. Jej sygnatariuszami jest ponad 70 państw. Mimo to w latach 90. ubiegłego stulecia amerykański Departament Obrony przeznaczył na badania nad tego typu bronią kilkadziesiąt milionów dolarów. Według dostępnych szacunków, w XX wieku dokonano ponad 400 zamachów z użyciem broni biologicznej, chemicznej i nuklearnej. Prace nad jej pozyskaniem prowadzone są przez jawne ugrupowania terrorystyczne (np. Al Quaida, sekta Raineeshee) oraz niektóre państwa (np. Korea Północna) [5]. Przeciwwagą dla tego rodzaju działalności ma być aktywność „reszty świata" na rzecz opracowania skutecznych systemów zapobiegania bioterroryzmowi.

2. Wirusy jako broń biologiczna

Wirusy znajdują się wysoko w rankingu czynników stanowiących potencjalną broń biologiczną. Wśród nich szczególne znaczenie mają poxwirusy, a także arenawirusy, filowirusy i flawiwirusy. Ich dostępność jest zróżnicowana, np. ospa prawdziwa, której czynnikiem etiologicznym jest poxwirus, uznawana jest za chorobę wykorzenioną, aczkolwiek oficjalne źródła podają, że szczepy tego drobnoustroju przechowywane są w dwóch ośrodkach wojskowych, amerykańskim i rosyjskim [4].

Wirus ospy prawdziwej uzyskał status broni biologicznej ze względu na jego wyjątkowe właściwości epidemiologiczne i infekcyjne, podobnie zresztą, jak w przypadku arbowirusów i robowirusów, należących do rodzin *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Togaviridae* oraz *Arenaviridae*, a także wirusów Ebola i Marburg z rodziny *Filoviridae* [4].

Wymienione wirusy są mikrobiologom znane i dokładnie opisane. Możliwa jest jednak przerażająca wizja użycia jako broni biologicznej wirusów nowo odkrytych lub znanych, lecz o zmienionych cechach epidemiologicznych. Manipulacje w obrębie genomu poxwirusów (np. poxwirusa małpiego) mogą przyczynić się do dramatycznego zwiększenia ich zjadliwości, jak to miało miejsce z poxwirusem mysim. Pojawienie się wirusa Zachodniego Nilu w Nowym Jorku w roku 1999 oraz jego rozprzestrzenienie się w całym kraju w latach następnych, jest doskonałą ilustracją możliwości pojawienia się nieoczekiwanych zmian w epidemiologii poważnych infekcji wirusowych. Rok rocznie stwierdza się na terenie Stanów Zjednoczonych Ameryki tysiące przypadków gorączki Nilu Zachodniego oraz zakażeń mózgu. Omawiany wirus może szerzyć się wraz z przetaczaną krwią, przeszczepianymi organami i przez łożysko. W roku 1993 w Ameryce Północnej i Południowej pojawiły się nowe wirusy Hantaan, będące czynnikami etiologicznymi zakażeń dolnych dróg oddechowych, charakteryzujących się znacznie większym współczynnikiem śmiertelności niż w przypadku wirusów gorączek krwotocznych przebiegających z ostrą niewydolnością nerek, występujących od dziesiątków lat na terenie Azji i Europy. *Aphthovirus*, należący do rodziny *Picornaviridae*, jest natomiast czynnikiem etiologicznym tzw. zespołu dłoni, stóp i ust (ang. foot-and-mouth disease). Oprócz infekcji wywoływanych wśród zwierząt hodowlanych, może również zakażać ludzi [5].

Wspomniany już poxwirus jest niezwykle groźnym dla człowieka patogenem. W przeszłości na różnych kontynentach odnotowywano endemiczne zachorowania na ospę prawdziwą. Wyróżniano tzw. ospę wielką lub inaczej klasyczną (śmiertelność do 30%) oraz ospę małą (śmiertelność ok. 1%). Rezerwuarem wirusa pozostaje wyłącznie człowiek, a okres wylęgania infekcji wynosi 3 tygodnie. Transmisja odbywa się drogą bezpośrednią (poprzez zakażony aerozol lub kontakt ze zmianami znajdującymi się na skórze i błonach śluzowych) oraz pośrednią (poprzez zanieczyszczoną odzież i przedmioty użytku codziennego). Choroba przebiega gwałtownie, z gorączką, silnymi bólami głowy, mięśni i grzbietu, uczuciem ogólnego rozbicia i coraz większego wyczerpania (objawy niespecyficzne, grypopodobne). Objawem patognomonicznym jest natomiast wysypka, przyjmująca kolejno formę plamek, grudek i krost. Wykwity pojawiają się najpierw na twarzy i kończynach, a następnie na tułowiu. Ostatnie zachorowanie na ospę prawdziwą odnotowano w 1977 roku, w następstwie czego trzynaście lat później Światowa Organizacja Zdrowia uznała tę chorobę za wyeradykowaną i podjęła decyzję o zaprzestaniu szczepień profilaktycznych [11]. W tym miejscu należy zaznaczyć, iż odporność po szczepieniu utrzymuje się zaledwie przez 3–5 lat, co oznacza, że użycie dziś poxwirusa jako broni biologicznej miałoby katastrofalne następstwa.

Kolejną grupą drobnoustrojów stanowiących potencjalne zagrożenie podczas ataku bioterrorystycznego są wirusy wywołujące zapalenie mózgu, przenoszone w zakażonym aerozolu, a także przez zainfekowane kleszcze i komary. Jak dotąd brak skutecznego leczenia zakażeń tymi wirusami. Procedury diagnostyczne również pozostawiają wiele do życzenia. Poszukuje się skutecznych szczepionek [1]. Kleszczowe zapalenie mózgu to jedno z najbardziej niebezpiecznych zakażeń w Europie i Azji. Czynnik etiologiczny, flawiwirus, należy do rodziny *Flaviviridae*. W Rosji co roku rejestruje się ok. 11 tys. zachorowań; w Europie – ok. 3 tys. przypadków. Wirusy o podobnej naturze, np. wirus gorączki omskiej, czy wirus gorączki lasu Kyasanur, klinicznie wywołują raczej gorączki krwotoczne niż *encephalitis* [8]. Doświadczenia związane z przeciwdziałaniem epidemii zakażeń wirusami Nilu Zachodniego są praktyczną lekcją ewentualnej walki ze skutkami bioterroryzmu, a także sposobów zwalczania innych zakażeń powodujących masowe następstwa sanitarno-epidemiologiczne, np. epidemie grypy [7].

Nowy wirus Nipah, należący do rodziny *Paramyxoviridae*, izolowano z przypadków zapaleń mózgu w Malezji. Jego właściwości epidemiologiczne (wysoka śmiertelność i trudności w kontroli epidemii w początkowym okresie, przyczyniające się do wzbudzania paniki) predysponują go do użycia podczas ataku bioterrorystycznego. Wirus może zakażać świnie, psy, koty, konie i nietoperze, i tą drogą infekować również populację ludzką [9].

Wirus zapalenia mózgu Zachodniego Nilu pojawił się późnym latem 1999 roku, wywołując zachorowania zarówno wśród ludzi, jak i wolno żyjących ptaków egzotycznych. Patogen najprawdopodobniej trafił do USA z Izraela, izolowane bowiem z tych obszarów szczepy wykazywały duże podobieństwo genetyczne.

Transmisja nastąpić mogła albo za pośrednictwem zakażonych papug i komarów, albo ludzi z wiremią. Drobnoustrój reprezentuje interesujący model broni biologicznej, nie poddającej się kontroli amerykańskiej służby zdrowia; jest przyczyną tysięcy zachorowań i setek zgonów na tamtym obszarze.

W przypadku wirusa wywołującego ciężki ostry zespół oddechowy (ang. severe acute respiratory syndrome – SARS), niezmiernie trudno odróżnić zachorowania występujące naturalnie od tych, będących wynikiem ataku bioterrorystycznego. Począwszy od 2003 roku, zarejestrowano ok. 1000 zgonów z powodu SARS. Ta liczba w żaden sposób nie dorównuje liczbie zgonów spowodowanych grypą, jednak omawiany koronawirus stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Trzeba także podkreślić konsekwencje ekonomiczne dla Azji Południowo-Wschodniej: straty ze względu na ustanie ruchu turystycznego oceniono na 950 milionów dolarów. Wirus odpowiedzialny za SARS jest przykładem adaptacji do nowego gospodarza [4].

Także wirus pryszczycy znajduje się na liście potencjalnych czynników możliwych do wykorzystania jako broń biologiczna. Współcześnie hodowla i uprawa roślin charakteryzują się masową produkcją, transportem i licznymi sytuacjami ułatwiającymi kontakt z omawianym patogenem [4].

Gorączki krwotoczne charakteryzują się podwyższoną temperaturą oraz poważnymi zaburzeniami krzepnięcia krwi, stąd wybroczyny podskórne, rozległe krwawienia narządów wewnętrznych i zakrzepy naczyniowe. Zakażenie wirusem następuje drogą kropelkową, a początkowe objawy infekcji są niestety niespecyficzne. Śmiertelność szacuje się w szerokich granicach, od 0,2% aż do 50–90%. Grupa wirusowych czynników etiologicznych wywołujących gorączki krwotoczne jest dość zróżnicowana: należą tu *Arenaviridae* (wirus argentyński, wenezuelski, boliwijski i gorączki Lassa), *Bunyaviridae* (wirusy Hantaan i gorączki krymsko-kongijskiej), *Filoviridae* (wirusy Ebola, Marburg, Denga i żółtej febry) (11).

W przypadku podejrzenia ataku bioterrorystycznego każdy pacjent z gorączką oraz objawami uszkodzenia naczyń (obniżone ciśnienie krwi, wybroczyny, zaczerwienienie lub przekrwienie twarzy i tułowia, obrzęki niewiadomego pochodzenia, a także krwawienia wywoływane przez drobne urazy) powinien być poddany diagnostyce różnicowej w kierunku wirusowej gorączki krwotocznej [11].

3. Profilaktyka

Potencjalne użycie broni masowego rażenia, biologicznej i chemicznej, musi skutkować poszukiwaniem adekwatnych metod przeciwdziałania na poziomie rządowym, służby zdrowia i służb porządkowych. Należy podkreślić znaczenie i potrzebę permanentnej edukacji w zakresie rozpoznania, ochrony i wykrywania ataków bioterrorystycznych oraz integracji działań podejmowanych przez wszystkie powołane do tego typu zadań służby, np. w Stanach Zjednoczonych utworzono regionalne centra koordynacji [1, 10].

W krajach Sojuszu Północnoatlantyckiego obowiązują różne systemy ochrony przed bronią biologiczną, ale tylko w niektórych z nich wyodrębniono w strukturach wojskowych Zespoły Rozpoznania Biologicznego, ukierunkowane wyłącznie na analizę skażeń biologicznych (np. Dania) [1].

W Europie „powołano do życia" Europejską Sieć Diagnostyki Ważnych Zakażeń Wirusowych, w ramach której badacze koncentrują się na infekcjach wywoływanych przez wirusy Hantaan, Denga, Lassa, filowirusy, koronawirusy i poxwirusy [6].

Wszystkie kraje zagrożone atakami terrorystycznymi, w tym także Polska, winny udoskonalać systemy ochrony przeciwepidemicznej w celu minimalizowania skutków ewentualnych ataków. Szczepionki są w tym przypadku mało skuteczne, gdyż zwykle czynnik etiologiczny nie jest rozpoznany dostatecznie szybko, a tempo rozprzestrzeniania się epidemii jest zbyt duże. Chemioterapia może okazać się cennym narzędziem w walce z wirusami wykorzystanymi jako broń biologiczna, pod warunkiem jednak, że nie użyto szczepów uzyskanych na drodze inżynierii genetycznej (np. o obniżonej wrażliwości na leki) [2, 3].

4. Podsumowanie

Groźba wykorzystania środków biologicznych wyraźnie wskazuje na potrzebę podejmowania adekwatnych działań na poziomie międzynarodowym. Każde osiągnięcie biotechnologiczne może mieć dwojakie przeznaczenie, stąd możliwe jest niestety ukrycie rzeczywistego celu prowadzenia badań i uzyskanie ofensywnych środków biologicznych pod pozorem legalnych badań naukowych. Istnieje także niebezpieczeństwo kradzieży procedur, technologii i innych materiałów przez terrorystów. Uwzględniając fakt, iż broń masowego rażenia, w tym broń biologiczna, pozostaje jednym z głównych zagrożeń współczesnego świata oraz, że wciąż brak skutecznych metod i środków zapobiegania i zwalczania skutków jej użycia, problem ten musi pozostawać w sferze zainteresowań badaczy reprezentujących różne dziedziny nauki. W związku z ciągłymi zmianami uwarunkowań religijnych i politycznych, bioterroryzm pozostaje zagrożeniem realnym, o znaczących reperkusjach dla zdrowia publicznego. Boleśnie odczuwane są ekonomiczne skutki ataku bioterrorystycznego (ustanie turystyki i inne zaburzenia społeczne).

Piśmiennictwo

1. Bossi P., Tegnell A., Baka A., Van Loock F.: Bichat guidelines for the clinical management of viral encephalitis and bioterrorism-related viral encephalitis. *Eur. Commun. Dis. Bull.* **9**, E21–22 (2004)
2. Chomiczewski K.: Algorytm postępowania obowiązujący lekarza pierwszego kontaktu w przypadku zagrożenia bioterroryzmem (w) Bioterroryzm. Zasady postępowania lekarskiego, red. K. Chomiczewski, J. Kocik, M.T. Szkoda, PZWL, Warszawa, 2002, s. 36
3. Clarke S. C.: Bacteria as potential tools in bioterrorism, with an emphasis on bacterial toxins. *Br. J. Biomem. Sc.* **62**, 40–47 (2005)
4. Denys A.: Współczesne zagadnienia bioterroryzmu. *Pol. Merk. Lek.* **12**, 132–135 (2002)
5. Denys A.: Zagrożenia związane z użyciem rzadziej występujących drobnoustrojów jako broni biologicznej. *Lek. Wojsk.* **83**, 17–20 (2007)
6. Donoso-Mantke O., Schmitz H., Zeller H., Heyman P.: Quality assurance for the diagnostics of viral diseases to enhance the emergency preparedness in Europe. *Eur. Commun. Dis. Bull.* **10**, 102–106 (2005)
7. Fine A., Layton M.: Lessons from the West Nile viral encephalitis outbreak in New York City, 1999: implications for bioterrorism preparedness. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 277–282 (2001)
8. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A.: Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* **57**, 129–146 (2003)
9. Lam S. K.: Nipah virus – a potential agent of bioterrorism? *Antiviral Res*. **57**, 113–119 (2003)
10. Robinson-Dunn B.: The microbiology laboratory's role in response to bioterrorism. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **126**, 291–295 (2002)
11. Szkoda M.T.: Wirusowe gorączki krwotoczne (w:) Bioterroryzm. Zasady postępowania lekarskiego, red. K. Chomiczewski, J. Kocik, M.T. Szkoda, PZWL, Warszawa, 2002, s. 190

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 267–273
http://www.pm.microbiology.pl

INTERAKCJE POMIĘDZY PAŁECZKAMI *SALMONELLA* I KOMÓRKAMI GOSPODARZA, IMPLIKACJE TERAPEUTYCZNE

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Marian Binek

Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedry Nauk Przedklinicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, tel. (22) 593 60 68, e-mail: marian_binek@sggw.pl

1. Wstęp. 2. Uruchomienie TTSS-1 warunkiem wnikania *Salmonella* do komórek nabłonka jelitowego. 3. Przeżywanie i namnażanie się pałeczek *Salmonella* w komórkach gospodarza zależne od TTSS-2. 4. Wpływanie na relacje miedzy patogenem a gospodarzem na poziomie molekularnym, jako nowa koncepcja terapeutyczna. 5. Podsumowanie

Interactions of *Salmonella* with host cells, therapeutic implications

Abstract: The ability of *Salmonella* spp. to enter host cells is central to establishing a successful infection. The entry into cells is dependent on the delivery of specific effector proteins into the host cell via SPI-1 encoded type III secretion system. The effectors are able to mimic the function of a variety of host-cell proteins and manipulate host biochemical functions such as signal transduction, cytokine production and actin cytoskeletal structure. The SPI-2 encoded type III secretion system translocates a second set of proteins after bacterial internalization which modulates host cytoskeletal organization and vesicular trafficking pathways. Thus, TTSS-1 is specialized for the invasion of gut epithelial cells and initiation of the intestinal inflammation, while TTSS-2 is essential for systemic infection and enhances intestinal inflammation. The conservation of structural components of TTSSs and their importance in *Salmonella* virulence make them an attractive target for chemical inhibition. A recent work has identified a set of small molecular compounds which are acylated hydrasons of salicylic aldehydes. They appear to have a generic effect on TTSS. Some of the compounds strongly inhibited Salmonella TTSS mediated invasion of epithelial cells *in vitro* and *enteritis in vivo*. These small-molecules also affected intracellular bacterial replication and blocked the transport of SPI-2 effector proteins. Therefore, they could be a viable alternative to conventional antibiotics.

1. Introduction. 2. TTSS-1 is required for *Salmonella* entry into gut epithelial cells. 3. TTSS-2 is essential for the ability of *Salmonella* to survive and to replicate inside host cells. 4. The possibility of targeting the pathogen-host molecular interface aa novel therapeutic strategy. 5. Conclusions

Słowa kluczowe: pałeczki *Salmonella*, interakcje patogen-gospodarz, salicylan acylowanych hydrazydów
Key words: *Salmonella* spp., pathogen-host interface, salicylidene acylhydrazides

1. Wstęp

W patogenezie wielu bakteryjnych chorób daje się zauważyć wspólny mechanizm polegający na modulowaniu struktury i funkcji komórek gospodarza przez drobnoustroje tak, aby mogły zrealizować własny cel, którym jest przetrwanie. Wytwarzane przez bakterie czynniki chorobotwórczości, wśród nich białka efektorowe, dostarczane są do komórki gospodarza za pomocą aparatu sekrecji typu III (ang. three type secretion system – TTSS) będącego konserwatywną molekularna strukturą wielobiałkową, biorącą początek w błonie cytoplazmatycznej oraz wystającą poza błonę zewnętrzną ściany komórkowej bakterii Gramujemnych [13, 14]. Nazywana jest również zespołem igłowym, strzykawką molekularną czy translokonem i umożliwia transport bakteryjnych białek z cytoplazmy bakterii do komórek eukariotycznych w następstwie kontaktu komórek bakterii i gospodarza. Dostarczane białka doprowadzają do przejściowych zmian strukturalnych komórek eukariotycznych umożliwiających wnikanie patogenom również do komórek nie fagocytujących, unikanie zabicia przez wyspecjalizowane komórki fagocytujące lub też namnożenia się w komórkach gospodarza w strukturach nie podlegających fuzji z lizosomami. Opisany sposób interakcji pomiędzy bakteriami i gospodarzem jest charakterystyczny również dla pałeczek *Salmonella* i został wypracowany przez miliony lat ewolucyjnego przystosowywania się bakterii do pasożytniczego sposobu życia [25, 33]. Bakterie te wpływają modyfikująco na komórkę gospodarza, produkując białka imitującego jego własne lub też strukturalnie odmienne, ale wypełniające funkcje identyczne jak białka gospodarza. Oddziaływanie tych czynników następuje w sposób przejściowy tak, aby zminimalizować zakłócenie homeostazy komórki gospodarza [13, 31]. W wyniku zakażenia pałeczkami *Salmonella*, które najczęściej następuje drogą pokarmową, bakterie obecne w jelitach poprzez kontakt z komórkami nabłonka jelitowego stymulują własną internalizację. Kaskada towarzyszących temu zjawisk uruchamiana jest w następstwie dostarczenia do

komórki gospodarza bakteryjnych białek efektorowych przez dwa TTSS kodowane w odrębnych regionach chromosomu *Salmonella* w miejscach określonych jako wyspy patogenności 1 i 2 (SPI-1, SPI-2) [15]. TTSS kodowany w SPI-1 (TTSS-1) decyduje o inwazji bakterii do komórek nabłonka jelitowego i indukcji *enteritis*. Białka efektorowe dostarczone do komórki przez ten system sekrecji modulują jej biochemiczne przemiany wpływając na szlaki transdukcji sygnału, produkcję cytokin i strukturę cytoszkieletu aktynowego. Wierzchołkowa część błony komórkowej w wyniku polimeryzacji aktyny ulega marszczeniu. Jej wgłobienie obejmuje bakterie i zamyka w ten sposób w pęcherzyku endocytarnym nazywanym SCV (ang. *Salmonella* containing vacuole). Białka dostarczane przez TTSS-1 indukują również rozwój zapalenia śluzówki jelita. Przeżywanie i namnażanie się bakterii w SCV determinowane jest przez białka kodowane przez geny zlokalizowane w SPI-2 i translokowane przez TTSS (TTSS-2). Przyczyniają się one do dojrzewania SCV, ochrony przed zabijaniem bakterii przez mechanizm tlenowy, rozprzestrzeniania się zakażenia oraz pogłębienia zmian zapalnych w jelicie [2, 3].

W przejawianiu się chorobotwórczości pałeczek *Salmonella*, TTSS pełni więc zasadniczą rolę i inaktywacja genów regulatorowych lub kodujących strukturalne komponenty systemu sekrecji, kompletnie znosi właściwości enteropatogenne i inwazję tych bakterii do komórek [31]. Hamując zatem powstawanie tej struktury lub blokując jej funkcje można bakterie pozbawić cech chorobotwórczości a tym samym uczynić je niezdolnymi do wywoływania zakażenia. Tego typu idea pokazuje nowe podejście do terapii chorób zakaźnych. Realizowana jest na razie na etapie doświadczeń z wykorzystaniem drobnocząsteczkowych związków interferujących funkcjonalnie z wybranymi czynnikami chorobotwórczości różnych bakterii. Dotychczasowe pozytywne wyniki z hamowaniem adhezji i produkcji toksyny przez drobnocząsteczkowe związki u *Vibrio cholerae*, hamowanie aktywności przez związki aromatyczne TTSS u enteropatogennych szczepów *E.coli*, czy przez salicylan acylowanych hydrazydów u *Yersinia enterocolitica* i *Chlamydia trachomatis*, zachęcają do badań na innych modelach patogenów w tym nad pałeczkami *Salmonella* [20, 30, 39].

2. Uruchomienie TTSS-1 warunkiem wnikanie *Salmonella* do komórek nabłonka jelitowego

Do ekspresji TTSS-1 dochodzi zarówno w hodowli pałeczek *Salmonella in vitro*, jak i w jelicie. Nie dotyczy to wszystkich komórek bakteryjnych lecz tylko około 20–40% z nich. Zostają one wyposażone w od 10 do100 aparatów sekrecji oraz w ich cytoplazmie pojawiają się cząsteczki białek efektorowych, dla przykładu od 3000 do 9000 cząsteczek białka sipA [33, 34]. Białka mogą być spontanicznie uwolnione poza komórkę bakteryjną, jednakże jest to proces powolny i mało wydajny. Z chwilą bezpośredniego kontaktu drobnoustroju z komórką nabłonka jelitowego dochodzi do gwałtownej, trwającej kilka sekund iniekcji białek efektorowych do komórki potencjalnego gospodarza. U dzikich szczepów *Salmonella* Typhimurium do całkowitej translokacji białek SipA i SopE potrzeba około 80 do 200 sekund. Na początku aktywacji ulegają tylko te aparaty TTSS-1, które pozostają w bezpośrednim kontakcie z komórką gospodarza. Jednakże w wyniku dostarczonych przez nie białek zaczynają się przemiany w komórce nabłonka, w wyniku których marszcząca się błona części apikalnej otacza komórkę bakteryjną. To powoduje, że cała komórka bakteryjna ma fizyczny kontakt z błoną komórki gospodarza, co z kolei aktywuje pozostałe aparaty TTSS, które dotychczas nie stykały się z komórką eukariotyczną i przyspiesza proces translokacji do niej. Molekularny mechanizm, który wyzwala proces dostarczania bakteryjnych białek efektorowych do komórek gospodarza nie jest do końca jasny. Białka wydzielane przez TTSS-1 można podzielić na dwie grupy: translokacyjne i efektorowe [2, 3, 32]. Białka translokacyjne SipB, SipC i SipD (ang. *Salmonella* invasion protein) umiejscowione są na końcu igły TTSS (translokonu) i tworzą pory w błonie plazmatycznej komórki gospodarza, dzięki czemu możliwe jest dostarczenie do niej białek efektorowych [8]. Białka SipB i SipC przytwierdzają TTSS do błony protoplazmatycznej i to one tworzą kompleks translokacyjny a białko SipD prawdopodobnie reguluje tym procesem [8, 27, 33, 34]. Sekrecją białek dostarczanych przez tranlokon regulują również białka chaperonowe TTSS [1]. Niektóre dane wskazują na bezpośrednie wiązanie się białka SipB z cholesterolem błony plazmatycznej komórki eukariotycznej, co inicjuje utworzenie się translokonu. Niewykluczone jednak, że w uruchomieniu TTSS-1 bierze udział nie tylko sam cholesterol, ale również jego połączenia z tłuszczami, białkami czy cukrami [17].

Aby pałeczki *Salmonella* wniknęły do komórki gospodarza potrzebnych jest co najmniej pięć białek efektorowych oddziałujących na drodze różnych mechanizmów na cytoszkielet aktynowy. Niektóre białka translokacyjne wykazują również funkcje białek efektorowych, jak np. SipC i wpólnie z SipA oddziałują lokalnie w komórce gospodarza i bezpośrednio na aktynę, powodują jej polimeryzację i tworzenie wiązek. SipA zwiększa polimeryzację aktyny oraz kontroluje jej depolimeryzację przez białka gospodarza, między innymi hamując aktywność białek gospodarza (ADF/kofilina i gelsolina) tnących filamenty aktyny. Sip A zaangażowane jest także w migrację zależną od kinazy C neutrofilów przez warstwy nabłonka. SipC rów-

nież inicjuje nukleację (tworzenie geometrycznych form przestrzennych przez aktynę) i polimeryzację aktyny [19, 27]. Wydaje się jednak, że wspomniane białka powodują powstawanie lokalnych drobnych ognisk filamentów aktynowych w miejscach, w których dochodzi do kontaktu bakterii z komórką gospodarza. Nie są w stanie spowodować marszczenia błony plazmatycznej w takim stopniu, aby wpływało to na wnikanie bakterii do komórki nabłonka jelitowego [33]. Do istotnej rearanżacji cytoszkieletu aktynowego dochodzi pod wpływem innych tzw. późniejszych białek efektorowych znanych jako Sops (ang. *Salmonella* outer proteins), takich jak SopE, SopE2 i SopB oddziałujących w różnych miejscach komórki gospodarza [8, 40]. Nie reagują one bezpośrednio z aktyną, ale wpływają na szereg wewnętrznych szlaków przekaźnictwa sygnału w konsekwencji czego dochodzi do polimeryzacji aktyny i restrukturyzacji cytoszkieletu. Białka SopE i SopE2 imitują funkcje eukariotycznych czynników wymiany nukleotydu guanylowego (GEF, ang. guanine nucleolide exchanging factor) i katalizują usunięcie GDP a tym samy związanie się GTP. Następuje to za pośrednictwem drobnocząsteczkowych GTPaz z rodziny Rho, przede wszystkim Cdc42 i Rac1 kontrolowanych przez cykl GTPazowy [12, 31]. Mają one dwa regiony peptydowe określane jako Switch I i Switch II, w których dokonują się zmiany konformacyjne w zależności od tego, jaki nukleotyd jest przyłączony. Przyłączenie GTP powoduje aktywny stan białka, w którym konformacje Switch I i Switch II pozwalają na zainicjowanie kaskady przemian doprowadzających do zmian w cytoszkielecie. Hydroliza GTP do GDP powoduje nieaktywny stan GTA-az w wyniku konformacyjnych zmian w regionach Switch [25]. SopE jest szczególnie aktywnym czynnikiem wymiany nukleotydu guanylowego, chociaż ulega szybkiej degradacji przez wewnątrz komórkowe proteazy. Można zauważyć pewną specyfikę do aktywowania GTPaz przez białka *Salmonella* i tak SopE2 aktywuje Cdc42, podczas gdy SopE aktywuje zarówno Cdc42, jak i Rac1 [11].

Kolejne białko efektorowe SopB jest fosfatazą fosfatydyloinozytolu i oddziałuje również na proces przebudowy cytoszkieletu za pośrednictwem GTPaz Rho, chociaż nie bezpośrednio tylko za pośrednictwem GEF gospodarza z rodziny Dbl [40]. Białko to wiązane jest z później zmianami następującymi już po wniknięciu bakterii do komórki eukariotycznej i rozwijającym się zapaleniem oraz sekrecją płynów do światła jelita. Po translokacji białka SopB dochodzi do przemian metaboliczych komórkowego fosforanu fosfoinozytolu i fosforanu inozytolu przede wszystkim do ich defosforylacji [18]. Białko SopB aktywuje Akt, kinazę serynowo-treoninową (znaną również jako kinaza białkowa B, PBK), która pełni ważną rolę w regulacji wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych, wpływających na funkcje życiowe komórki, proliferację, zachowanie życia czy apoptozę [26]. Podczas wnikania pałeczek *Salmonella* do komórki, Akt przemieszcza się z cytoplazmy w kierunku błony protoplazmatycznej i zbiera się w marszczącej się części błony protoplazmatycznej, w której znajduję się również wysoka koncentracja trójfosforanu fosfatytydyloinozytolu [PtdIns(3,4,5)P_3]. SopB defosforyluje ten związek do dwufosforanu fosfatytydyloinozytolu [PtdIns(3,4,)P_2], który przyczynia się do gromadzenia się Akt i jej aktywacji, jak również eliminacji PtdIns(3,5)P_2 u podstawy pomarszczonej błony plazmatycznej oraz utrzymywania się fosforanu fosfatytydyloinozytolu [PtdIns(3)P] w błonie SCV [37]. Sprzyja to łączeniu się makropinocytotycznych pęcherzyków i tworzeniu fagosomu oraz dojrzewaniu SCV stanowiącego bezpieczną dla *Salmonella* wewnątrzkomórkową niszę, w której mogą się namnażać. Tak więc, w sposób pośredni i to białko wpływa na przebudowe cytoszkieletu komórki gospodarza i przyczynia się do przeżywania w niej pałeczek *Salmonella*. Aktywacja Cdc42 i Rac1 przez białka SopB, SopE i SopE2 przyczynia się do powstania i aktywacji kompleksu Arp2/3 (ang. actin related protein), który sprzyja nukleacji i tworzeniu odgałęzień przez aktynę [9]. W procesie tym uczestniczą białka zespołu Wiskott-Aldrich, jak np. N-WASP aktywowane bezpośrednio przez Cdc42 i PtdIns(4,5)P_2 oraz WAVE2 aktywowane przez Rac1 przy udziale wieloskładnikowego białkowego kompleksu Nap1-Pir121-Abil [36]. Oddziaływanie białka SopB trwa dłużej i zaznacza się również po utworzenie SCV między innymi udziałem w ochronie zakażonych komórek nabłonka jelitowego przed apoptozą czy stymulacją do produkcji tlenku azotu kontrolującego nadmierne namnażanie się bakterii [10]. Wydaje się, że mechanizmy te służą ochronie komórek gospodarza, które dają schronienie patogenowi.

Rearanżacja cytoszkieletu aktynowego i marszczenie błony plazmatycznej komórki nabłonka jelitowego zainicjowana przez *Salmonella* jest przejściowa i zwykle architektura komórki powraca do stanu normalnego po 2–3 godzinach od wniknięcia bakterii. W procesie tym pomaga gospodarzowi sam patogen produkując i transportując przez TTSS-1 dwuskładnikowe białko SptP (ang. *Salmonella* protein tyrosine phosphatase), którego jedna z dwu domen wykazuje aktywność GAP (ang. GTPaze activating protein) i znosi skutki aktywacji GTAaz Rho przez SopE i pozostałe białka uczestniczące w tym procesie, ponieważ przyspiesza hydrolizę GTP i tym samym przeprowadza GTPazy w stan nieaktywny [12]. Na dynamikę i rozłożenie w czasie przeciwstawnych sobie zjawisk indukowanych przez SopE i SptP w komórce gospodarza może mieć również wpływ dość szybka degradacja pierwszego i wolniejsza drugiego z białek, czym można tłumaczyć przemijająca aktywację GTAaz Rho.

3. Przeżywanie i namnażanie się pałeczek *Salmonella* w komórkach gospodarza zależne od TTSS-2

Jak przedstawiono to wcześniej, wnikaniu pałeczek *Salmonella* do komórek nabłonka jelitowego towarzyszy marszczenie błony apikalnej jej części oraz dynamiczne przemiany cytoszkieletu. Są to relatywnie krótko trwające zjawiska i po internalizacji bakterii, komórka gospodarza powraca do swojego normalnego stanu. Okazuje się jednak, że organizacja cytoszkieletu komórki gospodarza odgrywa również rolę w późniejszych etapach zakażenia, w czasie replikacji bakterii i przeżywania wewnątrz SCV. Do tego celu niezbędne są białka efektorowe transportowane przez TTSS-2, które regulują procesem reorganizacji cytoszkieletu, utrzymaniem integralności błony SCV oraz utworzeniem wypustek rozpościerających się z SCV tzw. Sifs (ang. *Salmonella* induced filaments) [22, 38]. Tworzenie Sifs jest silnie uzależnione od organizacji mikrokanalików. Po wniknięciu pałeczek *Salmonella* do komórki gospodarza i utworzeniu się pęcherzyka SCV dochodzi do ekspresji TTSS-2, co zwykle ma miejsce po około 3 godzinach od zakażenia [38]. Niskie pH pęcherzyka uruchamia iniekcję przez jego błonę wielu białek efektorowych za pomocą TTSS-2. Zjawiska takie zachodzące w makrofagach decydują o rozwoju zakażenia uogólnionego. Produkcja i uwalnianie białek następuje w sposób ciągły, co zapewnia przetrwanie i namnażanie się bakteriom w dłuższym okresie czasu. Znanych jest co najmniej kilkanaście białek efektorowych dostarczanych do komórki gospodarza przez TTSS-2, których biochemiczna aktywność i struktury docelowe nie są do końca określone. Wiele z nich moduluje funkcje komórki gospodarza, w tym organizację cytoszkieletu i przemieszczania się błon, w szczególności wzdłuż mikrokanalików [28]. W pierwszym etapie wokół pęcherzyka daje się zauważyć polimeryzacje aktyny prawdopodobnie przy udziale białka SspH2, ale niewykluczone, że również przy udziale innych białek efektorowych. Po 3 do 4 godzin po zakażeniu, SCV przemieszcza się w okolicę jądra komórki gospodarza i poprzez kolejne białko efektorowe SseG łączy się z aparatem Golgiego. Prawdopodobnie fakt ten wpływa na namnażanie się pałeczek *Salmonella* wewnątrz SCV. Po 5–6 godzinach od internalizcji bakterii daje się zauważyć odchodzące od SCV długie wypustki (Sifs) o podobnym składzie jak błona pęcherzyka. Do ich powstania niezbędne są mikrokanaliki. Obecność Sifs jest wskaźnikiem późnego stadium zakażenia oraz początku bakteryjnej replikacji [6]. Innymi białkami zaangażowanymi w modulowanie błony SCV są SifA, SopD2, Ssef, SseG i SseJ. Lokalizują się one na błonie SCV i Sifs, co sugeruje ich bezpośredni udział w przemianie i zachowaniu integralności błony [7]. Na zachowanie ciągłości SCV, w szczególności wydaje się mieć wpływ SifA, ponieważ bakterie niezdolne do produkcji tego białka nie są w stanie zachować integralności pęcherzyka i uwalniają się do cytozolu komórki gospodarza. SifA jest powiązane z mikrotubulami i razem z białkiem gospodarza SKIP (ang. Sifa and kinesin-interacting protein) uczestniczy w powstawaniu Sifs oraz proksymalnej w stosunku do aparatu Golgiego lokalizacji SCV [4]. W tworzeniu Sifs przypisuje się również udział białkom SopD2, SseF i SseG. Zasadnicza funkcja białek SifA, SopD2, Ssef, SseG i SseJ wydaje się zatem sprowadzać do zapewnienia bakteriom wewnątrzkomórkowej niszy koniecznej do ich namnożenia się. Obniżona zjadliwość bakterii skorelowana jest z niezdolnością do namnażania się w makrofagach, co z kolei wynika z braku produkcji wspomnianych białek. Z drugiej strony u *Salmonella* Typhimurium, które nie miały zdolności do wytwarzania białka SopD, będącego homologiem SopD2 nie dochodziło do namnażania się bakterii w makrofagach i mimo, że bakterie utraciły zjadliwość to nie miało to wpływu na lokalizację oraz utworzenie SCV i Sifs. Precyzyjny mechanizm, poprzez który wspomniane białka wpływają na dojrzewanie pęcherzyka nie jest znany. Umiejscowienie SseF i SseG na mikrokanalikach sugeruje, że mogą one zakłócać zależny od sieci mikrokanalików transport białek w komórce gospodarza, aby zapewnić dojrzewanie SCV [23]. Z kolei SseJ ma domenę homologiczną do acylotransferazy, co może wskazywać na bezpośrednie modulowanie przez to białko lipidów wchodzących w skład SCV. Prawdopodobnie SifA i SopD2 stymulują łączenie się mikropęcherzyków w większe SCV, ponieważ białka te powodują agregacje i zaokrąglenie endosomów [6, 7]. Białka PipB, PiB2 i SiB są obecne w okolicy pęcherzyka SCV i Sifs, nie wykazano jednak ich udziału w przemianach strukturalnych komórki gospodarza, czy też wpływu na wewnątrzkomórkowe namnażanie się pałeczek *Salmonella* [21].

4. Wpływanie na relacje miedzy patogenem a gospodarzem na poziomie molekularnym jako nowa koncepcja terapeutyczna

Ostatnie lata przyniosły wiele nowych i szczegółowych danych na temat relacji na poziomie molekularnym pomiędzy pałeczkami *Salmonella* a gospodarzem. Nasunęły jednocześnie pomysł, aby wpływać na opisane wyżej zjawiska w sposób niezwykłe specyficzny i selektywny w celu wyeliminowania struktur i organelli determinujących zjadliwość bakterii, jak np. TTSS, czy też zablokowania funkcji wytwarzanych białek efektorowych, często na poziomie reakcji między atomami struktur gospodarza i czynników bakte-

ryjnych [24, 25, 35]. Ponieważ funkcjonowanie tych organelli nie jest niezbędne do życia pałeczkom *Salmonella*, potencjalne leki, które będą hamowały ich aktywność mogą się przyczynić do obniżenia lub wyeliminowania cech zjadliwości a nie samych bakterii, przez co można spekulować, nie będzie dochodziło do wykształcania się mechanizmów oporności, jak to ma miejsce w przypadku stosowania klasycznych chemioterapeutyków. Dodatkowo opisane organella i czynniki chorobotwórczości są nieobecne lub niewytwarzane u większości bakterii niechorobotwórczych. Potencjalne użycie więc środków terapeutycznych przeciwko nim skierowanych nie wpłynie niekorzystnie na mikroflorę fizjologiczną. Podobnie zablokowanie funkcji czynników o charakterze białek enzymatycznych również może być sposobem bardzo specyficznego oddziaływania terapeutycznego. Czynnikami docelowymi mogą być bakteryjne białka o funkcji GAP, jak np. Sptp lub GEF, jak np. SopE imitujące oddziaływanie ich eukariotycznych odpowiedników w komórce gospodarza. Niewykluczone, że wielokierunkowe oddziaływanie bakteryjnych czynników zjadliwości będzie wymagało jednoczesnego wpływania na wiele z nich [35]. Jakakolwiek jednak możliwość obniżania zjadliwości drobnoustroju daje większą szansę na uruchomienie przez makroorganizm mechanizmów obronnych, które mogą przyczynić się do eliminacji patogenu. Zachowawcza struktura składowych TSST oraz niezwykłe znaczenie tego organellum w przejawianiu się zjadliwości pałeczek *Salmonella*, spowodowało, że podjęto próby chemicznego hamowania jego funkcji. Wcześniej wykazano, że drobnocząsteczkowe związki salicylanu acylowanych hydrazydów w sposób specyficzny hamują funkcje tego organellum u *Yersinia pseudotuberculosis* i *C. trachomatis* [20, 30, 39]. Postanowiono więc sprawdzić, czy wspomniane substancje działają również na TSST u *Salmonella*. W doświadczeniu *in vitro* przeprowadzonym przez N e g r e a i wsp. na modelu *Salmonella* Typhimurium, w którym użyto dziewięciu strukturalnie podobnych salicylanów acylowanych hydrazydów i dodawano je do hodowli wspomnianego szczepu wykazano, że blokują one inwazję bakterii do komórek nabłonka linii MDCK [29]. Nie obserwowano podczas tego procesu obecności białek kodowanych w SPI-1, jak np. SipA, SipB i SipC. Zjawisko to potwierdzili Hudson i wsp., którzy wyjaśnili, że wspomniane związki nie hamują wzrostu *Salmonella*, lecz blokują zależną od TSST-1 sekrecję białek efektorowych [16]. Reakcja jest zależna od dawki użytych związków i im jest ona większa tym efekt blokowania wnikania bakterii do komórek eukatriotycznych jest silniejszy. Najwyższa użyta w doświadczeniu dawka 100 mM nie wywoływała efektu cytotoksycznego w hodowli komórek HeLa, natomiast kompletnie hamowała wnikanie do nich bakterii. Podobnie salicylany acylowanych hydrazydów dodawane do hodowli *Salmonella* hamowały tworzenie w błonach erytrocytów por przez białko SipA. Okazało się również, że hodowanie *in vitro Salmonella* Typhi w obecności wspomnianych związków a następnie podanie takiej hodowli do pętli jelitowej u cieląt nie prowadzi do powstania odpowiedzi sekrecyjnej i zapalnej. Bezpośrednie podanie do pętli jelitowej *Salmonella* i salicylanu acylowanych hydrazydów nie wpływało w sposób widoczny na akumulację płynu do światła jelita, czy powstawanie odczynu zapalnego. Wkrótce wyjaśniono, że nieobecność białek Sips w hodowlach *Salmonella* traktowanych wspomnianymi związkami nie wynika z braku ekspresji kodujących je genów, lecz zablokowania ich translokacjii z cytoplazmy komórek bakteryjnych do komórek eukariotycznych. Fakt ten wzbudził podejrzenie, że salicylany acylowanych hydrazydów prawdopodobnie blokują ekspresję elementów składowych TSST lub też interferują z jego aktywnością. W kolejnych doświadczeniach udowodniono, że wyciszają one transkrypcję genów SPI-1, kodujących aktywator transkrypcji HilA, białko translokonu PrgH, ale również białko efektorowe SipC. Wyciszeniem transkrypcji kluczowych genów SPI-1 można więc wytłumaczyć obserwowane zjawisko braku białek efektorowych w hodowlach *Salmonella* w obecności wspomnianych związków. Udowodniono również, że salicylany acylowanych hydrazydów hamują namnażanie się bakterii po ich wniknięciu do mysich makrofagów linii RAW 264.7. W sposób naturalny namnażanie się pałeczek *Salmonell*a w makrofagach hamowane jest przez tlenek azotu (NO) produkowany w wyniku aktywacji indukowanej syntetazy nadtlenkowej. Z kolei czynniki kodowane przez geny SPI-2 interferując z NO komórek gospodarza stwarzają korzystniejsze warunki do namnażania się bakterii. Dodatek do hodowli makrofagów zakażonych pałeczkami *Salmonella* salicylanu acylowanych hydrazydów powodował wzrost ilości NO i tym można wytłumaczyć hamowanie w nich wzrostu bakterii. W procesie tym wykluczono bezpośrednie oddziaływanie salicylanu acylowanych hydrazydów na syntetazę nadtlenkową, natomiast potwierdzono jego oddziaływanie na bakteryjny TSST-2. Okazało się, że salicylany acylowanych hydrazydów ograniczają również ruch bakterii, ponieważ hamują ekspresję genów kodujących rzęski i ujawnianie się tej cechy. Tak więc, wspomniane związki oddziałujące na TTSS zależny od SPI-1 i SPI-2 w podobny sposób wpływają na system warunkujący poruszanie się bakterii. Daje się zauważyć pewne różnice w oddziaływaniu różnych salicylanów acylowanych hydrazydów na TSST, co może wynikać z pierwszorzędowej struktury wchodzących w jego skład białek i reagujących z nimi cząsteczek wspomnianych substancji. Podobnie

stwierdza się drobne różnice w oddziaływaniu tych związków na TSST u *Chlamydia*, *Yersinia* i *Salmonella*, co z kolei sugeruje nieco odmienny dla nich punkt uchwytu u tych bakterii, stwarza jednak możliwości specyficznego oddziaływania na różne drobnoustroje.

5. Podsumowanie

W wyniku dokonującej się przez miliony lat koewolucji pałeczek *Salmonella* i ich gospodarzy, doszło do wykształcenia przez bakterie szeregu skomplikowanych mechanizmów, poprzez które modulują funkcje komórek gospodarza podporządkowując je własnym celom. Uwalniane z komórek bakterii czynniki zjadliwości, w sposób pośredni (oddziaływanie na szlak transdukcji sygnału) lub bezpośredni (oddziaływanie na białka cytozolu) doprowadzają do internalizacji patogenu, jego replikacji i przetrwania w komórkach gospodarza. Wykorzystywany do dostarczania przez pałeczki *Salmonella* do komórki gospodarza inwazyjnych czynników aparat sekrecji trzeciego typu, zbudowany jest podobnie jak u wielu innych bakterii z konserwatywnych białek. Struktura ta wydaje się być pewną odkrywaną słabością potogenu, ponieważ tworzące TTSS białka mogą być punktami uchwytu dla hamujących ich funkcję substancji chemicznych. Idea ta znajduje potwierdzenie, na razie na etapie nielicznych doświadczeń, w blokowaniu zjadliwości pałeczek *Salmonella* poprzez zastosowanie drobnocząsteczkowych substancji salicylanu acylowanych hydrazydów. Niewykluczone, że zaprezentowana koncepcja będzie początkiem nowej strategii terapii bakteryjnych chorób zakaźnych.

Piśmiennictwo

1. Akeda Y., Galan J.E.: Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, **437**, 911–915 (2005)
2. Binek M., Błaszczak B.: Mechanizmy zakażenia pałeczkami *Salmonella*. *Post. Mikrobiol.* **45**, Supl.1, 27–38 (2006)
3. Binek M.: Patogeneza *enterocolitis* spowodowanego zakażeniem *Salmonella* Typhimurium. (w:) Monografia „Świat człowieka światem drobnoustrojów", red. W. Hryniewicz, Copyright 2007, Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, Warszawa, s. 113–119 (2007)
4. Boucrot E., Henry T., Borg J.P., Gorvel J.P., Meresse S.: The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science*, **308**, 1174–1178 (2005)
5. Boyle E.C., Brown N.F., Finley B.B.: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. *Cell Microbiol*. **8**, 1946–1957 (2006)
6. Brumell J.H., Goosney D.L., Finley B.B.: SifA, a type III secreted effector of *Salmonella typhimurium*, directs Salmonella-induced filament (Sif) formation along microtubules. *Traffic*, **3**, 407–415 (2002)
7. Brumell J.H., Kujat-Choy S., Brown N.F., Vallance B.A., Knodler L.A., Finley B.B.: SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella typhimurium* that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. *Traffic*, **4**, 36–48 (2003)
8. Collazo C.M., Galan J.E.: The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol. Microbiol.* **24**, 747–739 (1997)
9. Criss A.K., Casanova J.E.: Coordinate regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion of epithelial cells by the Arp2/3 complex. *Infect. Immun*. **71**, 2885–2891 (2003)
10. Drecktrah D., Knodler L.A., Galbraith K., Steele-Mortimer O.: The *Salmonella* SPI1 effector SopB stimulates nitric oxide production long after invasion. *Cell. Microbiol*. **7**, 105–113 (2005)
11. Friebel A., IIchmann H., Aelpfelbacher M., Ehrbar K., Machleidt W., Hardt W.D.: SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of Rho GTPases of the host cell. *J. Biol. Chem*. **276**, 34035–34040 (2001)
12. Fu Y., Galan J.E.: A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, **401**, 293–297 (1999)
13. Galan J.E.: *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu. Rev. Cell. Dev. Bio.* **17**, 53–86 (2001)
14. Galan J.E., Wolf-Watz H.: Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, **444**, 567–573 (2006)
15. Hansen-Wester I., Hensel M.: *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect*. **3**, 549–559 (2001)
16. Hudson D.L., Layton A.N., Field T.R., Bowen A.J., Wolf-Watz H., Elofsson M., Stevens M.P., Galyov E.E.: Inhibiotion of tytpe III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by small-molecule inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemiother*. **51**, 2631–2635 (2007)
17. Hayward R.D., Cain R.J., McGhie E.J., Phillips N., Garner M.J., Koronakis V.: Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol. Microbiol*. **56**, 590–603 (2005)
18. Hernandez L.D., Hueffer K., Wenk M.R., Galan J.E.: *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science*, **304**, 1805–1807 (2004)
19. Higashide W., Dai S., Hombs V.P., Zhou D.: Involvement of SipA in modulating actin dynamics during *Salmonella* invasion into cultured cells. *Cell. Microbiol*. **4**, 357–365 (2002)
20. Kauppi A.M., Nordfelth R., Uvell H., Wolf-Watz H., Elofsson M.: Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Chem. Biol*. **10**, 241–249 (2003)
21. Knodler L.A., Steele-Mortimer O.: The *Salmonella* effector PipB2 affects late endosome/lysosome distribution to mediate Sif extension. *Mol. Biol. Cell*. **16**, 4108–4123 (2005)
22. Kuhle V., Hensel M.: Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell. Mol. Life Sci*. **61**, 2812–2826 (2004)
23. Kuhle V., Jackel D., Hensel M.: Effector proteins encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2 interfere with the microtubule cytoskeleton after translocation into host cells. *Traffic*, **5**, 356–370 (2004)
24. Layton A.N., Galyov E.E.: *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. *Expert review in molecular medicine*, **9**, 1–16 (2007)
25. Lilic M., Stebbins C.E.: Re-structuring the host cell: up close with *Salmonnella's* molecular machinery. *Microbes Infec*. **6**, 1205–1211 (2004)

26. Marcus S.L., Wenk M.R., Steele-Mortimer O., Finley B.N.: A synaptojanin-homologous region of Salmonella typhimurium SigD is essential for inositol phosphatase activity and Akt activation. *FEBS Lett*. **394**, 201–207 (2001)
27. McGhie E.J., Hayward R.D., Koronakis V.: Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bunding of actin. *EMBO J.* **20**, 2131–2139 (2001)
28. Miao E.A., Brittnacher M., Haraga A., Jeng R.L., Welch M.D., Miller S.I.: *Salmonella* effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol. Microbiol*. **48**, 401–415 (2003)
29. Negrea A., Bjur E., Ygberg S.E., Elofsson M., Wolf-Watz H., Rhen N.: Salicylidene acylhydrazides that affect type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antimicrob. *Agents Chemiother*. **51**, 2867–2876 (2007)
30. Nordfelth R., Kauppi A.M., Norberg H.A., Wolf-Watz H., Elofsson M.: Small-molecule inhibitors specifically targeting type III secretion. *Infect. Immun*. **73**, 3104–3114 (2005)
31. Patel J.C., Rossanese O.W., Galan J.E.: The functional interface between *Salmonella* and its host cell: opportunities for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol. Sci*. **26**, 564–570 (2005)
32. Roy D., Liston D.R., Idone V.J., Di A., Nelson D.J., Pujol C., Bliska J.B., Chakrabarti S., Andrews N.W.: A process for controlling intracellular bacterial infections induced by membrane injury. *Science*, **304**, 1515–1518 (2004)
33. Schlumberger M.C., Muller A.J., Ehrbar K., Winnen B., Duss I., Stecher B., Hardt W.D.: Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* sipA injection into host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12548–12553 (2005)
34. Schlumberger M.C., Hardt W.D.: *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr. Opin. Microbiol*. **9**, 46–54 (2006)
35. Stebbins C.E., Galan J.E.: Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1. *Mol. Cell*, **6**, 1449–1460 (2000)
36. Stradal T.E., Rottner K., Disanza A., Confalonieri S., Innocenti M., Scita G.: Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell. Biol.* **14**, 303–311 (2004)
37. Terebiznik M.R., Vieira O.V., Marcus S.L., Slade A., Yip C.M., Trimble W.S., Meyer T., Finley B.B., Grinstein S.: Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes fission during invasion by *Salmonella*. *Nat. Cell Biol*. **4**, 766–773 (2002)
38. Waterman S.R., Holden W.D.: Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell. Microbiol*. **5**, 501–511 (2003)
39. Wolf K.H., Betts J., Chellas-Gery B., Hower S., Linton C.N., Fields K.A.: Treatment of *Chlamydia trachomatis* with a small molecule inhibitors of the Yersinia type III secretion system disrupts progression of the chlamydial developmental cycle. *Mol. Microbiol.* **61**, 1543–1555 (2006)
40. Zhou D., Chen L.M., Hernandez L., Shear S.B., Galan J.E.: *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol. Microbiol*. **39**, 248–260 (2001)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 275–281
http://www.pm.microbiology.pl

WYSTĘPOWANIE *BARTONELLA* SPP. W WYBRANYCH REZERWUARACH I WEKTORACH NA TERENIE POLSKI

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Edyta Podsiadły*, Stanisława Tylewska-Wierzbanowska

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. (22) 542 12 61
* Autor korespondencyjny: e-mail: epodsiadly@pzh.gov.pl

1. Wprowadzenie. 2. Dane epidemiologiczne na temat bartonelozy w Polsce. 3. Jak dochodzi do zakażenia człowieka *Bartonella* spp.? 4. Znany rezerwuar *Bartonella* spp. na świecie i w Polsce 5. Wektory *Bartonella* spp. Kleszcze jako prawdopodobny wektor *Bartonella* spp. 6. Charakterystyka polskich szczepów *B. henselae*

Prevalence of *Bartonella* spp. in the reservoir and vectors in Poland

Abstract: Infections due to *Bartonella* species are recently considered emerging diseases. During the last decade of the 20th century their incidence rates have increased several times. The clinical spectrum of *Bartonella* infections in humans is expanding. Few studies have been accomplished about *Bartonellae* in Poland. Some dealt with the presence of *Bartonella* in the reservoir, the others in vectors.

Our study of the seroprevalence *Bartonella spp*. in risk groups showed specific *B. henselae* antibodies in 45% and 53% of veterinarians and cat owners, respectively. They were also detected in 44% of examined homeless alcoholics. In 2 persons from this group also specific *B. quintana antibodies* were detected.

In Mazoviecki province, we detected *Bartonella* spp. in 10.2% of examined cats and in Lubelskie province *B.bovis* in 30% of studied cows. Among 14 isolated strains from cats, 13 were classified as *B. henselae*, 1 as *B. clarridgeiae.* The majority (92%) of *B. henselae* strains had genotype II. We also found DNA of *B. henselae* in vectors – ticks *I. ricinus*, *D. reticulatus* and biting flies. About 3% of examined ticks were positive whereas we found *Bartonella* spp. DNA in 1 out of 60 studied flies.

These data demonstrate that *Bartonella* spp. are distributed in the environment in Poland, both in animals: cats, dogs, cows (reservoir) and arthropods: ticks, flies (possible vector).

1. Introduction. 2. Epidemiological data about bartonellosis in Poland. 3. What are the routes of *Bartonella* transmission to humans? 4. Recognized reservoir of *Bartonella* spp. worldwide and in Poland. 5. Vectors of *Bartonella* spp. Ticks as possible vectors of *Bartonella* spp. 6. Characteristics of Polish *B. henselae* strains

Słowa kluczowe: *Bartonella* spp., wektor, rezerwuar
Key words: *Bartonella* spp., vector, reservoir

1. Wprowadzenie

Bartonelozy są chorobami występującymi na całym świecie. Do niedawna bakterie je wywołujące były mało znaczącymi patogenami, którym nie poświęcano wiele uwagi. Obecnie znanych jest 20 gatunków zaklasyfikowanych do rodzaju *Bartonella*, ponad połowa spośród nich jest patogenami człowieka [3, 8, 15]. Rozwój wiedzy na temat bartoneloz wiąże się głównie z wprowadzeniem do diagnostyki tych zakażeń zaawansowanych metod molekularnych o wysokiej czułości. Bartonelozy u ludzi są wywoływane przez znane od prawie 100 lat dwa gatunki *B. bacilliformis* i *B. quintana* oraz poznane w ciągu ostatnich 20 lat *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffi*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. koehlerae*, *B. washoensis*, *B. alsatica*, *B. clarridgeiae B. rochalimae* sp. nov., *B. tamiae* sp. nov. [5, 8, 15].

B. henselae jest odpowiedzialna za najwięcej zakażeń o tej etiologii. Wiąże się to prawdopodobnie z rozpowszechnieniem bakterii tego gatunku na wszystkich kontynentach. U osób immunokompetentnych *B. henselae* najczęściej wywołuje chorobę kociego pazura (ang. cat-scratch diseases – CSD), najpowszechniej rozpoznawaną bartonelozą na świecie [3]. Postacie kliniczne zakażeń wywołanych przez *B. henselae* dotyczą szeregu schorzeń, począwszy od łagodnych zakażeń bezobjawowych do zapalenia mózgu czy zapalenia wsierdzia. Pozostałe gatunki rodzaju *Bartonella* izolowane od chorych z zapaleniem wsierdzia to: *B. quintana*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. kohlerae*, *B. alsatica*, *B. grahamii.* Szacuje się, że około 3–4%, a według innych źródeł 1–15%, wszystkich przypadków zapalenia wsierdzia jest wywołanych właśnie przez *Bartonella* sp. [22, 26, 45]. Opisane przypadki zapalenia wsierdzia związanego z *B. henselae* wskazują, że na *endocarditis* o tej etiologii szczególnie podatne są osoby z uszkodzonymi zastawkami [3, 19, 26, 29]. Zapalenia wsierdzia o tej etiologii nie są rozpoznawane

w rutynowo wykonywanych posiewach krwi. Najczęstszą metodą diagnostyczną ich detekcji jest wykrywanie wysokiego poziomu swoistych przeciwciał techniką immunofluorescencji [26, 33]. Zakażenie *Bartonella* należy brać pod uwagę poszukując przyczyn gorączki o nieokreślonej etiologii, limfadenopatii, chorób oczu (*neurorenitis*, *uveitis*, *Parinauld oculoglandural syndrome*), *myocarditis*, zaburzeń neurologicznych.

Bartonele to bakterie wywołujące również zakażenia oportunistyczne. *B. quintana* u chorych z AIDS jest przyczyną *bacillary angiomatosis*. U tych chorych opisuje się ciężki przebieg CSD ze zmiany chorobowymi w różnych organach m.in.: wątrobie (*peliosis hepatis*), skórze (*bacillary angiomatosis*), płucach, zastawkach serca, kościach, centralnym układzie nerwowym [15, 26].

2. Dane epidemiologiczne na temat bartonelozy w Polsce

Mimo danych wskazujących na znaczne rozpowszechnienie CSD na całym świecie, w Polsce limfadenopatię o tej etiologii rozpoznaje się sporadycznie. Z szacunkowych danych opierających się na badaniach serologicznych wynika, że w roku 1998 rozpoznano 21 zachorowań na CSD, w 1999 – 30, w 2000 – 55, w 2001 – 40, w 2002 – 45, w 2003 – 37, w 2004 – 59, w 2005 – 90, w 2006 – 34, w 2007 – 79. Wyliczony na tej podstawie współczynnik zapadalności w kolejnych latach wahał się od 0,05 do 0,25 na 100 000 osób [44]. Dla porównania, w Belgii współczynnik zapadalności wynosi 0,69 na 100 000 mieszkańców [11], w Holandii 12,5 na 100 000 osób [1], w USA 9,3 na 100 000 leczonych ambulatoryjnie chorych [1]. Na uwagę zasługuje fakt, że w niektórych województwach przez 10 lat nie próbowano potwierdzić serologicznie nawet jednego przypadku CSD. Dotyczy to województw: lubuskiego i opolskiego. Według badań przeprowadzonych w Niemczech [15] i Francji [15] bakterie należące do gatunku *B. henselae* są odpowiedzialne za większość limfadenopatii u dzieci i dorosłych w tych krajach. Sytuacja ta ma związek ze świadomością lekarzy i z powszechnym wykonywaniem badań diagnostycznych w tym kierunku.

Kilka lat temu przeprowadzone zostały badania na temat występowania zakażeń *Bartonella henselae* i *B. quintana* w wybranych grupach ryzyka w Polsce [6]. Zbadano 120 osób, w tym 29 bezdomnych alkoholików, 6 narkomanów, 20 weterynarzy, 15 właścicieli kotów. Grupę odniesienia stanowiło 50 dawców krwi. Zakażenie *Bartonella* spp. wykrywano metodą serologiczną, oznaczając poziom swoistych dla *B. henselae* i *B. quintana* przeciwciał klasy IgG i IgM techniką immunofluorescencji pośredniej. Jako miano znamiennie dodatnie przyjęto wartość 1:64 dla przeciwciał klasy IgG i 1:10 dla przeciwciał IgM. Swoiste dla *B. henselae* przeciwciała klasy IgG wykryto u 48,3% (14/29) bezdomnych alkoholików, u 45.0% (9/20) weterynarzy i u 53.3% właścicieli kotów. W grupie kontrolnej przeciwciała dla tych bakterii stwierdzono u 24% krwiodawców. U żadnego z badanych bezdomnych narkomanów nie wykryto przeciwciał dla *B. henselae* i *B. quintana.* Najwyższe miana przeciwciał dla *B. henselae* wykrywano u właścicieli kotów (1:4096). W pozostałych grupach badanych najwyższe wykrywane miana wynosiły: u bezdomnych alkoholików 1:256, u wetrynarzy 1:128. Wysokie miana wynoszące 1:256 i 1:1024 przeciwciał klasy IgG swoistych dla *B. quintana* stwierdzono u dwóch bezdomnych alkoholików.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że zakażenia *B. henselae* wśród osób bezdomnych w Polsce są prawie dwukrotnie częstsze niż w zdrowej populacji [6]. Przeprowadzone badania wskazują również, że w Polsce także występują zakażenia *B. quintana*. Zdrowi ludzie mają kontakt z *Bartonella* spp. za pośrednictwem zwierząt obecnych w ich otoczeniu. Wynikiem takich kontaktów są występujące sporadycznie schorzenia o tej etiologii. Częściej kontakt skutkuje bezobjawowym zakażeniem, którego dowodem są swoiste przeciwciała wykrywane w krwi zdrowych osób.

3. Jak dochodzi do zakażenia człowieka *Bartonella* spp.?

Zakażenia *Bartonella* spp. reprezentują grupę chorób transmisyjnych. Ponieważ krew jest naturalnym środowiskiem dla tych patogenów, udział hematofagicznego wektora jest podstawową drogą przenoszenia *Bartonella* spp. Zdolność gatunków rodzaju *Bartonella* do długotrwałego utrzymywania się we krwi gospodarza jest ich istotną ewolucyjnie zdobyczą umożliwiającą przetrwanie [26]. Obecne przez wiele miesięcy we krwi gospodarza bakterie zwiększają prawdopodobieństwo przetrwania gatunku [8, 21]. Rezerwuarem tych drobnoustrojów jest wiele gatunków dziko żyjących i domowych ssaków.

Innym sposobem transmisji tych patogenów jest mechaniczne przeniesienie z jednego osobnika na drugiego [26]. Wśród narkomanów zakażenie *B. quintana* jest przenoszone przez igły używane przez kilka osób. Pazury kotów zabrudzone odchodami pcheł zawierającymi *B. henselae*, przy zadrapaniu mechanicznie przenoszą zakażenie na ludzi [9].

W przypadku wielu, zwłaszcza nowo opisanych gatunków rodzaju *Bartonella* dotychczas brak jest danych na temat przenoszącego wektora lub alternatywnego sposobu transmisji, jak np.: zakażenia *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. washoensis*, *B. alsatica* [8, 26].

4. Znany rezerwuar *Bartonella spp.* na świecie i w Polsce

Rezerwuarem gatunków należących do rodzaju *Bartonella* są zwierzęta domowe i dzikie. Wśród zwierząt domowych naturalnym środowiskiem dla tych bakterii są koty i psy. Gatunki zwierząt dzikich u których bakterie te wywołują bezobjawowe, długo utrzymujące się bakteriemie to: krowa, sarna, kojot, wiewiórka ziemna, królik, kret, kangur oraz gryzonie *Rattus norvegicus*, *Clethrionomys glareoulus*, *Microtus agresitis*, *Apodermus flavicolis*, *Peromyscus leucopus.* Dla *B. quintana* i *B. bacilliformis* naturalnym biologicznym środowiskiem jest człowiek, chociaż *B. quintana* została niedawno wykryta w krwi kotów i psów, co obala twierdzenie, że człowiek jest jedynym gospodarzem [2, 3, 8, 18, 26, 32].

W naszych badaniach prowadzonych w Polsce skupiliśmy się na stwierdzeniu obecności *Bartonella* spp. w rezerwuarach istniejących w najbliższym otoczeniu człowieka, to znaczy u zwierząt domowych: kotów, psów i krów [42].

W pierwszych badaniach poddano ocenie występowanie zakażenia *B. henselae* u 137 kotów i 54 psów [42]. Zwierzęta były zdrowe i pochodziły z obszarów miejskich Warszawy i okolic. Od zwierząt pobierano krew i prowadzono hodowlę na podłożu czekoladowym z IsoVitalex przez 4–6 tygodni w atmosferze 5% CO_2. W krwi badanych zwierząt wykrywano również swoiste dla *B. henselae* przeciwciała klasy IgG. W przypadku psów dodatkowo wykrywano przeciwciała dla *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii.* Od 14 z 137 badanych kotów (10,2%) wyhodowano 19 szczepów *Bartonella* spp. Ze względu na małą aktywność biochemiczną bakterii należących do tego rodzaju, identyfikację wyhodowanych szczepów wykonanometodą: PCR-RFLP dla fragmentu genu syntetazy ryboflawinowej (*rib C*) oraz sekwencjonowania produktów reakcji PCR dla fragmentu genu syntetazy cytrynianowej *gltA* [27,39]. Spośród 19 izolatów: 18 zidentyfikowano jako należące do gatunku *B. henselae*, a jeden jako *B. clarridgeiae*. U 45% badanych kotów stwierdzono występowanie swoistych dla *B. henselae* przeciwciał w mianie 1:64. Najwyższe z określonych mian wynosiło 1:4096.

Wyniki naszych badań wskazują, że najistotniejszym czynnikiem ryzyka zakażenia *Bartonella* sp. u kotów jest tryb życia. U kotów wychodzących na zewnątrz stwierdzono znacznie częste występowanie przeciwciał dla *B. henselae* jak i częstszą bakteriemię, niż u kotów niewychodzących (42,9% i 17,1% kotów wychodzących ze swoistymi przeciwciałami i bakteriemią vs 13,1% i 0 u kotów niewychodzących z domu).

Od żadnego z badanych psów nie wyhodowano *Bartonella* spp. Hodowla *Bartonella* spp. z krwi psów jest bardzo trudna. Problem wynika z niewielkiej gęstości tych bakterii we krwi tych zwierząt. Z 1 ml krwi zakażonego psa wyrastają 1–4 kolonie *Bartonella* spp. [4]. Dla porównania, u kotów bakterie te we krwi osiągają gęstość sięgającą 10^4–10^6 CFU/ml [2]. U 27 spośród 54 badanych psów stwierdzono obecność swoistych dla *B. henselae* przeciwciał. Należy jednak zaznaczyć, że u 96,2% z seropozytywnych zwierząt przeciwciała występowały w niskich mianach 1:64, a tylko u jednego z psów stwierdzono miano 1:512. Psy są uznanym rezerwuarem *B. vinsonii* subsp. *berkhofii.* Ze względu na niską czułość hodowli, oznaczenie występowania przeciwciał jest jedynym sposobem stwierdzenia obecności bakterii tego gatunku w ich pierwotnym rezerwuarze. Wyniki naszych badań są podobne do danych z innych krajów europejskich, w których stwierdzano obecność swoistych przeciwciał u około 5% badanych psów [42]. Opisano pojedyncze przypadki transmisji zakażenia *Bartonella* spp. z psów na człowieka oraz przypadek *osteomyelitis* po zadrapaniu przez psa [28, 49]. Ostatnio pojawiło się doniesienie o stwierdzeniu na podstawie badań serologicznych zakażenia *B. vinsonii* u dzieci z limfadenopatią pogryzionych przez psy. Na możliwość zakażenia w wyniku pogryzienia przez psa wskazują ostatnie badania D u n c a n i wsp., którzy w ślinie 11,4% psów wykryli trzy gatunki rodzaju *Bartonella*: *B. bovis*, *B. henselae* i *B. quintana* [17].

Ostatnim z badanych przez nas rezerwuarów *Bartonella* spp. są krowy. Dotychczas od bydła wyhodowano 4 gatunki z rodzaju *Bartonella*: *B. schoenbuchensis* i *B. capreoli* wyizolowane z krwi sarny oraz *B. bovis* i *B. chomelii* wywołujące bakteriemie u krów [35]. *B. bovis*, wcześniejsza nazwa *B. weissii*, została po raz pierwszy wyizolowana z krwi kotów w USA [2]. Po wyhodowaniu *B. bovis* od bydła stwierdzono 80% homologię między szczepami należącymi do *B. weissii*. Ze względu na znaczne rozpowszechnienie *B. bovis* sięgające około 30–35% u bydła przypuszcza się, że nastąpiło przeniesienie tych bakterii do kotów.

Zbadaliśmy 55 krów z województwa lubelskiego. W próbkach krwi pobranych od tych zwierząt, w reakcji PCR z rodzajowo swoistymi starterami stwierdziliśmy obecność DNA *B. bovis* u 30% badanych zwierząt.

Pomimo, że dotychczas u ludzi nie zdiagnozowano zakażenia *B. bovis*, bakterie te należy traktować jako potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka ze względu na ekspozycję na zakażoną krew podczas uboju bydła, zabiegów weterynaryjnych czy polowań na zwierzynę płową. Ostatnio pojawiły się doniesienia wskazujące u krów na *endocarditis* o tej etiologii [35].

5. Wektory *Bartonella* spp. Kleszcze jako prawdopodobny wektor *Bartonella* spp.

Wektorami *Bartonella* spp. przenoszącymi bakterie bezpośrednio ze zwierząt stanowiących ich rezerwuar na zwierzęta wrażliwe, są ssące krew stawonogi

np. kot – pchła (*B. henselae*) – kot. W przypadku transmisji patogenów do zwierząt będących przypadkowymi gospodarzami danego gatunku *Bartonella*, zwierzę z którego została przeniesiona infekcja stanowi źródło zakażenia np. kot – odchody pchły (*B. henselae*/*B. clarridgeiae*) – człowiek. Zakażenie przypadkowego gospodarza zawsze skutkuje rozwojem bartonelozy. Podczas gdy u żywicieli pierwotnych stanowiących rezerwuar *Bartonella* wystepuje bezobjawowa bakteriemia.

Jak wspomniano wcześniej, wektorami bakterii z rodzaju *Bartonella* są krwiopijne stawonogi. Do grupy tej należą między innymi: pchła kocia *Ctenocephalides felis*, muszki piaskowe *Lutzomia verrucarum*, wszy odzieżowe *Pediculus humanis*, pchła szczurza *Xenopsylla cheopis*. Każdy z wektorów wykazuje specyficzność zarówno w odniesieniu do żywiciela jak i gatunku *Bartonella* [9, 10].

W ostatnich kilku latach zwraca się uwagę na bardzo prawdopodobną rolę kleszczy w transmisji tych patogenów. Już w 1926 roku opisano eksperymentalne przeniesienie *B. bacilliformis* na małpy przez *Dermacentor andersoni.* Kleszcze żywiły się na zakażonych zwierzętach przez 5 dni. Po tym czasie częściowo najedzone stawonogi zostały usunięte i umieszczone na zdrowych małpach. W wyniku infestacji zakażonymi kleszczami u badanych zwierząt doszło do zakażenia i rozwoju infekcji [12]. W kilku przeprowadzonych w ostatnim czasie badaniach w ośrodkach europejskich i amerykańskich, DNA *Bartonella* spp. (*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. quintana* i *B henselae*) wykrywano w stadium nimfy i stadium dorosłym u głodnych i najedzonych kleszczy [1, 23, 31, 43, 47, 48].

Hipotezę o kleszczach jako wektorze *Bartonella* spp. potwierdzają liczne dowody pośrednie jak: wykrycie *Bartonella* DNA we krwi osoby pokłutej przez kleszcze [37], *B. henselae* bakteriemię u 3 chorych bez kontaktu z kotem pokłutych przez kleszcze [34]. Wykazano, że silna infestacja kleszczami jest istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia u psów swoistych przeciwciał dla *Bartonella* spp. (OR 14.2) [41].

Szereg wątpliwości dotyczących udziału kleszczy w przenoszeniu *Bartonella* spp. zostało wyjaśnionych w opublikowanej w 2008 roku pracy zespołu M. Vayssier-Taussat [12]. Wykorzystali oni metodę sztucznego karmienia kleszczy do weryfikacji powyższej hipotezy. Badanie przeprowadzono na grupie 433 kleszczy *I. ricinus* w tym 200 larw, 178 nimf i 55 postaci dorosłych. Wszystkie kleszcze żywiono krwią owczą zakażoną *B. henselae* do momentu osiągnięcia przez nie sytości. Krew wymieniano dwa razy dziennie w ciągu całego doświadczenia. Następnie kleszcze przechodziły w kolejne stadium rozwojowe, a dorosłe samice składały jaja. Po dwóch miesiącach okresu spoczynkowego kleszcze ponownie żywiono jałowa krwią. Po 84 godzinach kleszcze usuwano i badano na obecność w ich gruczołach ślinowych i tkankach ciała DNA *B. henselae* (PCR) i żywych bakterii tego gatunku (hodowla). Ponadto zhomogenizowanym materiałem z gruczołów ślinowych *I. ricinus* zakażano koty, żeby zbadać patogenność szczepów przeniesionych przez stawonogi. DNA *B. henselae* stwierdzono u wszystkich (100%) nimf i w 67% dorosłych kleszczy żywionych w poprzednim stadium zakażoną *B. henselae* krwią. Wynik taki wskazuje, że DNA bakterii utrzymało się w kleszczach w czasie wszystkich procesów zachodzących podczas linienia i przeobrażenia w kolejne stadium. Świadczy o transtadialnym przekazie bakterii *Bartonella.* Mimo, że DNA *B. henselae* wykryto w jajach złożonych przez samice żywione zakażoną krwią, materiału genetycznego tych bakterii nie stwierdzono w larwach z nich wyklutych. Ten wynik wskazuje, że prawdopodobnie *Bartonella* nie jest przekazywana następnym pokoleniom kleszczy. Istotnym spostrzeżeniem przeprowadzonego eksperymentu jest potwierdzenie żywotności i patogenności przekazywanego szczepu. *B. henselae* została wyhodowana na sztucznym podłożu z gruczołów ślinowych zakażonych kleszczy. Materiał z tych gruczołów wywołał u kota wysoki poziom bakteriemmi o tej etiologii w ciągu 2 tygodni od zakażenia. Kolejnym etapem potwierdzenia udziału *I. ricinus* w przenoszeniu *Bartonella* byłoby wykazanie infekcji u zwierząt po ukłuciu przez zakażonego *Bartonella* spp. kleszcza [12].

Celem przeprowadzonych przez nas badań było stwierdzenie obecności drobnoustrojów należących do rodzaju *Bartonella* u dorosłych postaci kleszczy gatunku *I. ricinus* i *Dermacentor reticulatus.* Zbadano 447 dorosłe kleszcze, w tym 242 gatunku *I ricinus* i 205 *D. reticulatus*. Dwieście osiemdziesiąt jeden kleszczy zebrano metodą flagowania z roślinności z różnych obszarów Polski: Warszawa i okolice, Białowieża, okolice Biebrzy natomiast 166 ze zwierząt: psów, kotów i krów z terenów województwa mazowieckiego (Warszawa i okolice), łódzkiego (Radomsko) i lubelskiego (Biała Podlaska). DNA *Bartonella* spp. wykrywano w reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do fragmentu genu *gltA* [39].

U 1 ze 205 badanych kleszczy gatunku *D. reticulatus* stwierdzono obecność fragmentów *Bartonella* spp. Po porównaniu sekwencji uzyskanego amplikonu ze zgromadzonymi w kolekcji NCBI, stwierdzono >80% homologi z odpowiadającym mu fragmentem genu syntetazy cytrynianowej *B. quintana.* Kleszcz ten został zebrany z roślinności na terenach zielonych Warszawy (Czerniaków).

Fragmenty DNA *Bartonella* wykryto u 9 z 242 badanych kleszczy *I. ricinus*. Kleszcze, w których stwierdzono obecność DNA *Bartonella* spp. zebrane było podczas ich żerowania na zwierzętach: 8 zebrano

z psów, a 1 z krowy. Jeden z psów, z których usunięto wspomniane kleszcze pochodził z województwa łódzkiego, pozostałe z Warszawy. W 7 przypadkach otrzymane sekwencje amplikonów były w 99% homologiczne z fragmentem genu syntetazy cytrynianowej gatunku *B. henselae*.

Mimo, że wyniki naszych prac wskazują na kleszcze jako możliwy wektor *Bartonella* spp., dalsze badania są niezbędne dla ostatecznego potwierdzenia tej hipotezy.

Niedawno H a l o s i wsp. [24] stwierdzili obecność *B. schoenbuchensis*, *B. chomelii*, *B. bovis*, *B. capreoli* (gatunki *Bartonella* izolowane od przeżuwaczy) w muchach należących do rodziny *Hippoboscidae*: *Lipoptena cervi*, *Hippobosca equina*, *Melophagus ovinus.* W naszych badaniach nad rozprzestrzenieniem *Bartonella* w różnych wektorach poddaliśmy ocenie możliwość transmisji tych bakterii przez muchy. Zbadano 60 much odłowionych w oborach, w których znajdowały się krowy ze stwierdzoną bakteriemią *B. bovis.* Z owadów izolowano DNA, a następnie poszukiwano DNA *Bartonella* spp. metodą PCR [30]. U jednej z badanych much stwierdzono obecność fragmentu DNA genu *gltA* homologicznego (>80%) do fragmentu tego genu u *B. quintana.*

Doniesienia te są sygnałem sugerującym możliwość pojawienia się nowego zagrożenia w bezpośrednim otoczeniu człowieka. Zwłaszcza, że zmiany w środowisku spowodowane działalnością człowieka, przyczyniły się m.in. do: przesunięcia rozprzestrzenienia pasożytniczych owadów i pajęczaków, zmian w ich składzie gatunkowym, zmian w przebiegu aktywności sezonowej. Obserwowanym obecnie zjawiskiem jest przesunięcie zasięgu wystepowania pasożytniczych owadów i pajęczaków, w tym kleszczy w kierunku aglomeracji miejskich. Ocieplenie klimatu i zmiana wilgotności w siedliskach stawonogów ma wpływ na wydłużenie czasu ich aktywności sezonowej, co przekłada się również na wydłużenie okresu, w którym może dojść do transmisji zakażenia.

6. Charakterystyka polskich szczepów *B. henselae*

Zarówno identyfikacja jak i charakterystyka szczepów *B. henselae* prowadzone są przede wszystkim metodami molekularnymi.

Podstawowym podziałem w obrębie gatunku *B. henselae* jest podział na dwa genotypy: genotyp I i genotyp II. W obrębie genotypu I wyróżnia się wariant Houston-1 i ZF-1. Natomiast genotyp II dzieli się na wariant: Marseille i CAL-1. Przynależność do określonego genotypu determinuje posiadanie przez dany szczep określonego profilu białkowego, charakterystyki antygenowej, zjadliwości i jest równoznaczna z przynależnością do serotypu Marseille lub Houston-1 [20]. Filogenetyczny podział na genotyp I i II jest szeroko przyjęty i zaakceptowany, jednak jego znaczenie nie jest do końca udowodnione. Kilka doniesień wskazuje na większą zjadliwość szczepów należących do genotypu I, wyniki innych badań wykluczają taki związek [20]. Wyniki naszych badań przeprowadzonych na 11 szczepach *B. henselae* wyhodowanych od polskich kotów wskazują, że za wywoływanie CSD na terenie Polski mogą być odpowiedzialne oba genotypy. Analiza wykonana metodą PCR ze starterami BH1/16SF dla genotypu I i starterami BH2/16SF dla genotypu II, wykazała u 10 z badanych szczepów genotyp II a u 1 genotyp I.

Wyhodowane szczepy *B. henselae* poddano genotypowaniu techniką MLVA i PFGE. Zastosowano kombinację pięciu VNTRs (variable-numer tandem repeats). Amplifikację i rozdział prowadzono w warunkach opisanych przez Monteil i wsp. [36]. W wyniku typowania szczepów metodą MLVA uzyskano dziesięć różnych profili. Wykonana przez nas analiza chromosomalnego DNA badanych szczepów *B. henselae* metodą PFGE, po cięciu enzymem restrykcyjnym *Sma I* wykazała istnienie wśród nich 6 typów wzorów PFGE (A, B, C, D, E, F). Uzyskane wyniki porównano z danymi epidemiologicznymi na temat kotów, od których zostały wyhodowane badane szczepy. Dwa z analizowanych szczepów pochodziły od kotów, które mieszkały w tym samym domu i od których pobrano w tym samym czasie krew na posiew. Zarówno w metodzie MLVA jak i PFGE szczepy te sklasyfikowano jako należące do tych samych typów. Wynik ten potwierdza dużą siłę dyskryminującą MLVA przy jednocześnie zachowanej czułości tej metody. Wstępne porównanie polskich szczepów z wyhodowanymi we Francji, Niemczech i na Filipinach wykazało u 8 szczepów obecność oryginalnego profilu z 3 allelami w obrębie dwóch loci niewystępującym poza Polską. Technika MLVA umożliwia przeprowadzenie typowania bez konieczności wyhodowania izolatów. Jest to szczególnie ważne przy różnicowaniu izolatów obecnych w próbkach klinicznych u chorych na CSD, wyhodowanie szczepów z pobranego od nich materiału klinicznego jest sporadyczne. Obecnie CSD w Polsce rozpoznaje się na podstawie badania histopatologicznego wycinka z węzła chłonnego, a w drugiej kolejności – badania serologicznego. Badanie histopatologiczne węzła chłonnego może jedynie wskazywać na CSD, gdyż podobne zmiany w węźle występują w przypadku bartonelozy, tularemii, gruźlicy i innych limfadenopatii wywołanych przez bakteryjne czynniki, a niekiedy także zmiany nowotworowe [7]. Wprowadzenie kolejnego kryterium diagnostycznego w postaci wykrywania fragmentów DNA *B. henselae* w wycinkach z węzłów chłonnych od osób z podejrzeniem CSD jest

istotnym narzędziem diagnostycznym zarówno w przypadkach wyników wątpliwych jak i podstawowych badań różnicujących [43]. Rutynowo wykonywane badanie wykrywające DNA *Bartonella* spp. w chorobowo zmienionych węzłach chłonnych może być również bardzo użyteczne w przypadku konieczności różnicowania między zakaźnym lub nowotworowym podłożem choroby. Wyizolowane od chorych DNA *B. henselae* może być w dalszym etapie wykorzystane do badań epidemiologicznych co przyczyni się do poszerzenia istniejącej wiedzy na temat bartoneloz w Polsce.

Piśmiennictwo

1. Adelson M.E., Rao R.S., Tilton R.C., Cabets K., Eskow E., Fein L., Occi J.L., Mordechai E.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi, Bartonella* spp*. Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in northern New Jersey. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2799–2801 (2004)
2. Bermond D., Boulouis H.J., Heller R., Van Laere G., Monteil H., Chomel B.B., Sander A., Breitschwerdt E.B., Kordick D.L.: Bartonella infection in animals: carrieership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 428–438 (2000)
3. Boulouis H.J., Chang C.C., Henn J.B., Kasten R.W., Chomel B.: Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet. Res*. **36**, 383–410 (2005)
4. Breitschwerdt E.B., Atkins C.E., Brown T.T., Kordic D.L., Snyder P.S.: *Bartonella vinsonii subspecies berkhoffii* and related members of the alpha subdivision of the Proteobacteria in dogs with cardiac arrythmias, endocarditis, or myocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3618–3626 (1999)
5. Brenner D.J., O'Connor S., Winkler H.H., Steigerwalt A.G.: Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea,* with descriptions of *Bartonella quintana* com. nov., *Bartonella henselae* comb. nov. , and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from order *Rickettsiales. Intern. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 777–786 (1993)
6. Chmielewski T., Podsiadły E., Tylewska-Wierzbanowska S.: Presence of *Bartonella* spp. in various human polpulations. *Pol. J. Microbiol.* **56**, 33–38 **(**2007)
7. Chomel B.B., Boulouis H.J., Breitschwerdt E.B.: Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **224**, 1270–1279 **(**2004)
8. Chomel B.B., Boulouis H.J., Maruyama S., Breitschwerdt E.B.: *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 389–394 (2006)
9. Chomel B.B., Kasten R.W., Floyd-Hawkins K., Chi B.: Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1952–1956 (1996)
10. Chung C.Y., Kasten R.W., Floyd-Hawkins K., Chi B., Yamamoto K., Roberts-Wilson J.,Gurfield A.N., Abbott R.C., Pedersen N.C., Koehler J.E.: *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1311–1313 (2004)
11. Comer J.A., Flynn C., Regenery R.L., Vlahov D., Childs J.E.: Antibodies to *Bartonella* species in inner-city intravenous drug users in Baltimore, MD. *Arch. Intern. Med.* **156**, 2491–2495 (1996)
12. Cotte V., Bonnet S., Le Rhun D.L., Le Naour E., Chauvin A., Boulouis H.J., Lecuell B., Linin T., Vayssier-Taussat M.: Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg. Infe. Dis.* **7**, 1074–1080 (2008)
13. Dehio C., Piémont Y.: Bartonella bovis Bermond sp. nov. and Bartonella capreoli sp. nov., isolated from European ruminants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **52**, 383–390 (2002)
14. Dehio C.: Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Ann. Rev. Microbiol.* **58**, 365–390 (2004)
15. Dehio C.: Recent progress in uderstanding *Bartonella*-induced vascular proliferation. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 61–65 (2003)
16. Demanche C., Alliot A., Guillot J.,Piemont Y, Boulois H.J., Vayssier-Taussat M.: Bartonella chomelii sp. nov., isolated from French domestic cattle (Bos taurus). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 215–220 (2004)
17. Duncan A.W., Maggi R.G., Breitschwerdt E.B.: Bartonella DNA in dog saliva. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1948–50 (2007)
18. Fabbi M., De Giuli L., Tranquillo M., Bragoni R, Casiraghi M., Genchi C.: Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian stray cats: evaluation of serology to assess the risk of transmission of Bartonella to humans. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 264–268 (2004)
19. Fournier P.E., Didier R. i wsp.: Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine*, **80**, 245–251 (2001) (cytowana praca jest dziełem 14 autorów)
20. Fournier P.E., Robson J., Zeaiter Z., McDougall R., Byrne S., Raoult D.: Improved culture from lymph nodes of patients with cat scratch disease and genotypic characterization of Bartonella henselae isolates in Australia. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3620–3624 (2002)
21. Greub G., Raoult D.: *Bartonella*: new explanation for old disease. *J. Med. Microbiol.* **51**, 915–923 (2002)
22. Guyot A., Bakhai A., Fry N., Merritt J., Malnick H., Harrison T.: Culture-positive *Bartonella quintana* endocarditis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* **18**, 145–147 (1999)
23. Halos L., Jamal T., Maillard R., Beugnet F., Le Menach A., Boulouis H.J.,Vayssier-Taussat M.: Evidence of *Bartonella* spp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia* sp. *Vet. Res.* **36**, 79–87 (2005)
24. Halos L., Jamal T., Maillard R., Girard B., Guillot J., Chomel B., Vayssier-Taussat M., Boulouis H.J.: Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of Bartonella spp. infecting wild and domestic ruminants. *App. Environ. Microbiol.* **70**, 6302–6305 (2004)
25. Henn J.B., Liu C.H., Kasten R.W., VanHorn B.A., Beckett L.A., Kass P.H., Chomel B.B.: Seroprevalence of antibodies against Bartonella species and evaluation of risk factors and clinical signs associated with seropositivity in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **66**, 688–694 (2005)
26. Jacomo V., Kelly P.J., Raoult D.: Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 8–18 (2002)
27. Johnson G., Ayers M., McClure S.C.C., Richardson S.E., Tellier R.: Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). *J. Clin. Microbiol*. **41**, 1069–1072 (2003)
28. Keret D., Giladi M., Kletter Y., Wientroub S.: Cat-scratch disease osteomyelitis from a dog scratch. *J. Bone. Joint. Surg. Br*. **80**, 766–767 (1998)

29. Kordic D.L., Breitschwerdt E.B.: Persistent infection of pets within a household with three Bartonella species. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 325–328 (1998)
30. Kordic D.L., Brown T.T., Shin K., Breitschwerdt E.B.: Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1536–1547 (1999)
31. Kordic S.K., Breitschwerdt E.B., Hegarty B.C., Southwick K.L.: Coinfection with multiple tickborne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2631–2638 (1999)
32. Kosoy M., Morway C., Sheff K.W., Bai Y., Colborn J., Chalcraft L., Dowell S.F., PeruskiL.F., Maloney S.A., Petersen L.R.: *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. *J. Clin. Microbiol*. **46**, 772–775 (2008)
33. La Scola B., Raoult D.: Culture of Bartonella quintana and Bartonella henselae from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1899–1905 (1999)
34. Lucey D., Dolan M.J., Moss C.W., Garcia M., Hollis D.G., Wegner S., Morgan G., Almeida R., Leong D., Greisen K.S.: Relapsing illness due to Rochalimaea henselae in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin. Infect. Dis.* 14, 683–688 (1992)
35. Maillard R., Petit E., Chomel B., Lacroux C., Schelcher F., Vayssier-Taussat M., Maillard R., Riegel P., Barrat F., Boulouis H.J i wsp.: Endocarditis in cattle caused by Bartonella bovis. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1383–1385 (2007)
36. Monteil M., Durand B., Bouchouicha R., Petit E., Chomel B., Arvand M., Boulouis H.J., Haddad N.: Development of discriminatory multiple-locus variable number tandem repeat Analysis for Bartonella henselae. *Microbiology*, **153**, 1141–1148 (2007)
37. Morozova O.V., Chernousova N.I., Morozov I.V.: Detection of the Bartonella DNA by the method of nested PCR in patients after tick bites in Novosibirsk region. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 4,14–17 (2005)
38. Noguchi H.: Etiology of Oroya fever: V. The experimental transmission of *Bartonella bacilliformis* by ticks (*Dermacentor andersoni*). *J. Exp. Med.* **44**, 729–734 (1926)
39. Norman A.F., Regenery R., Jameson P., Greene C, Krause D.C.: Differentiation of Bartonella-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1797–1803 (1995)
40. Noyola D.E., Holder D.L., Fishman M.A., Edward M.S.: Recurent encephalopathy in cat-scratch disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**, 567–568 (1999)
41. Pappalardo B.L., Correa M.T., York C.C., Peat C.Y., Breitscherdt E.D.: Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs. *Am. J. Vet. Intern. Med.* **58**, 467–471 (1997)
42. Podsiadły E., Chmielewski T., Marczak R., Sochon E., Tylewska-Wierzbanowska S.: *Bartonella henselae* in the human environment in Poland. *Scan. J. Infect. Dis.* **39**, 956–962 (2007)
43. Podsiadły E., Chmielewski T., Sochon E., Tylewska-Wierzbanowska S.: *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks removed from dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**, 189–192 (2007)
44. Podsiadły E., Sokołowska E., Tylewska-Wierzbanowska S.: Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* infections in Poland in 1998–2001. *Ann. NY. Acad. Sci.* **990**, 407–409 (2003)
45. Raoult D., Fournier P.E., Drancourt M.: Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* **125**, 646–652 (1996)
46. Rolain J.M., Lepidi H., Zanaret M.: Lymph node biopsy specimens and diagnosis of cat-scratch disease. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1338–1344 (2006)
47. SanogoY.O., Zeaiter Z., Caruso G., Merola F., Shpynov S., Brouqui P., Raoult D.: *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus ticks* (Acari: *Ixodida*) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 329–332 (2003)
48. Solano-Gallego L., Bradley J., Hegarty B., Sigmon B., Breitchwerdt E.B.: *Bartonella henselae* IgG antibodies are prevalent in dogs from southeastern USA. *Vet. Res.* **35**, 585–595 (2004)
49. Tsukahara M., Tsuneoka H., Iino H., Ohno K., Murano I.: *Bartonella henselae* infection from a dog. *Lancet*, **21**, 1682 (1998)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 283–286
http://www.pm.microbiology.pl

JERSINIOZA ZWIERZĄT I CZŁOWIEKA W ŚWIETLE BADAŃ WŁASNYCH

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Antoni J. Furowicz*, Danuta Czernomysy-Furowicz, Jolanta Karakulska, Magdalena Ferlas

Katedra Immunologii i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Akademia Rolnicza, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin, tel. (91) 454 15 21 w. 384
* Autor korespondencyjny: e-mail: dfurowicz@wp.pl

1. Wstęp. 2. Etapy badań. 3. Aspekty epidemiologiczne i kliniczne jersiniozy. 4. Odzwierzęce zakażenia człowieka. 5. Charakterystyka szczepów. 6. Podsumowanie

Yersiniosis in animals and humans in the light of our own research

Abstract: In the period between 1964 and 2006, yersiniosis was diagnosed in Beltsville turkeys, patas monkey, vervet monkey, chinchillas, nutrias, rabbits, cat, plains viscachas, European hares, guinea-pigs and foals. The disease took the form of an epidemic, endemic or occasional illness. It was also found in children as a family epidemic. Infection was generally affected the digestive tract including the liver and sometimes respiratory or nervous system. 70 *Y. pseudotuberculosis* strains were investigated; 60 strains were isolated from clinical materials and 10 strains from soil and water. 62 strains (88,6%) belonged to serotype 1, 6 (8,6%) to serotype 2 and 2 strains were not serologically determined. In the analyzed strains, the pathogenicity features were detected using the phenotypic and genotypic methods. The presence of *malF*, *malZ*, *lacY* and *lacZ* genes, which determine maltose and lactose fermentation stages, was detected in the analyzed strains. All strains were positive in the ONPG test, but did not ferment the lactose, which proves that they lack the ability to synthesize lactose permease.

1. Introduction. 2. The stages of research. 3. Epidemiological and clinical aspects of yersiniosis. 4. Animal-to-human infections. 5. Strains characteristics. 6. Summary

Słowa kluczowe: jersinioza, objawy kliniczne, patogeneza, właściwości fenotypowe i genotypowe, *Yersinia pseudotuberculosis*
Key words: yersiniosis, clinical symptoms, pathogenesis, phenotypic and genotypic properties, *Yersinia pseudotuberculosis*

1. Wstęp

Jersinioza (*Y. pseudotuberculosis*) jest groźną chorobą odzwierzęcą człowieka. Głównym rezerwuarem zarazka są wolno żyjące, hodowlane lub laboratoryjne gryzonie. Źródłem infekcji może być także woda lub warzywa kontaminowane kałem tych zwierząt [2, 4, 8, 9]. Zakażenia człowieka przebiegają w formie różnych syndromów klinicznych. Najczęściej są to: zapalenie węzłów chłonnych krezki jelitowej (objawy typowe dla ostrego zapalenia wyrostka robaczkowego lub odcinkowego zapalenia krętnicy), zapalenie jelita cienkiego lub żołądka i jelita cienkiego oraz stan zapalny cienkiego i grubego jelita (tzw. „brzuszna postać łagodna"), bakteriemia i posocznica przebiegające z dużą śmiertelnością (przekraczającą 30%), zakażenia ropne z różną lokalizacją (zapalenie stawów, opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie wątroby i śledziony, rumień guzowaty lub wielopostaciowy, zakażenie układu moczowego) oraz szkarlatynopodobna gorączka, występująca endemicznie w postaci epidemii na terenie wschodnich regionów byłego Związku Radzieckiego oraz w Japonii [1, 29]. Zapalenie krezkowych węzłów chłonnych występuje najczęściej u dzieci i młodzieży między 6 a 18 rokiem życia (częściej u chłopców niż u dziewcząt), brzuszna forma łagodna u pacjentów powyżej 18 roku życia, a rumień guzowaty głównie u kobiet w wieku 21–68 lat [1]. Ze względu na znaczną oporność na czynniki fizyczne oraz możliwości adaptacyjne *Y. pseudotuberculosis* poza organizmem gospodarza zarazki są stosunkowo często izolowane z wód powierzchniowych, gleby, roślin oraz z paszy [4, 8, 9]. Za czynniki powodujące zachorowanie ludzi i zwierząt, poza endotoksyną, uważa się integryny oraz inwazyny, których synteza odbywa się pod nadzorem genów obecnych w chromosomie bakterii lub w plazmidach. Szereg genów występuje w wyspach patogenności (virulon Yop oraz HPI). Dochodzi tam do syntezy wirulentnych białek Yops, hamujących reakcje obronne organizmu gospodarza [18].

2. Etapy badań

Badania realizowano w okresie 1964–2006. Ze względu na bardzo obszerny materiał, zostaną przedstawione najważniejsze i mniej znane elementy z zakresu epidemiologii oraz kliniki jersiniozy zwierząt i człowieka oraz biologii pałeczki *Y. pseudotuberculosis*. Prace badawcze i diagnostyka były realizowane

w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Katowicach (1964–1973 oraz 1976–1979), w Instytucie Rolniczym w Balcarce (Argentyna, prow. Buenos Aires, 1973–1976) oraz w Katedrze Immunologii i Mikrobiologii Akademii Rolniczej w Szczecinie (1979–2006). W pierwszym przypadku analizowano materiał zwierzęcy z terenu Górnego i Cieszyńskiego Śląska oraz Zagłębia, w drugim pochodził on z terenów Sierra de Balcarce oraz okolic nadmorskich Mar del Plata, w trzecim głównie z Pomorza Zachodniego.

3. Aspekty epidemiologiczne i kliniczne jersiniozy

Kilkakrotnie obserwowano wystąpienie tej choroby w formie enzootii [21, 24]. Po raz pierwszy w 1964 roku odnotowano masowe zakażenie w dużym stadzie indyków (*Meleagris gallopavo*), w skład którego wchodziły ptaki o szarym zabarwieniu oraz białej odmiany (*Beltsville*). Jest sprawą bardzo ciekawą, iż choroba wystąpiła tylko u białych indyków. Objawy kliniczne ograniczały się z reguły do osowiałości ptaków, braku apetytu oraz biegunki. W wyniku sekcji odnotowano zwyrodnienie wątroby oraz pojedyncze ogniska martwicze na powierzchni tego narządu. W rezultacie posiewu wycinków wątroby, nerek, płuc i serca stwierdzono wzrost w czystej kulturze bakterii *Y. pseudotuberculosis* [11]. Brak zachorowań wśród szarych indyków można wiązać ze zjawiskiem odporności rasowej. Szereg enzootii tej choroby odnotowano w hodowlach szynszyli [10, 20, 21, 24]. Zejścia śmiertelne występowały u tych gryzoni nagle, bez wyraźnych objawów klinicznych. Sekcyjnie stwierdzano najczęściej *pseudotuberculosis hepatis*, *enteritis catarrhalis*, *splenitis haemorrhagica*; u ciężarnych samic: ropomacicze, martwicę płodu z zaleganiem w tym narządzie. Histopatologicznie odnotowywano: martwicę hepatocytów z piknozą i rozpryskiem jąder, liczne ziarniniaki, ogniska zapalne utkane z histiocytów i neutrofilów [20]. W posiewach z reguły obserwowano wzrost w czystej kulturze ze wszystkich narządów *Y. pseudotuberculosis*, co może świadczyć o zakażeniu w postaci bakteriemii. Podobny przebieg choroby stwierdzono w Argentynie u wiskaczy i hodowlanej świnki morskiej [18]. Wiskacza (*Lagostomus maximus*) jest gryzoniem z rodziny szynszylowatych, występującym na pampie w Argentynie oraz w Paragwaju i Boliwii. Obserwowano liczne zejścia śmiertelne tych zwierząt. Izolacja jersinii z narządów wewnętrznych świnek morskich oraz z prób kału dzieci zostały uznane za pierwsze wyosobnienie tych drobnoustrojów w Argentynie [16, 17, 18]. W 1966 roku po raz pierwszy w Polsce stwierdzono jersiniozę u małp patasów oraz koczkodanów zielonych [28]. Choroba wystąpiła w Katowickim Ogrodzie Zoologicznym. Sekcyjnie u osobników padłych stwierdzono nieżyt błony śluzowej jelit grubych z tendencją do owrzodzeń, obrzęk i przekrwienie krezkowych węzłów chłonnych, splenohepatomegalię oraz bardzo liczne ogniska gruźliczopodobne w wątrobie i śledzionie. Podobne zmiany anatomopatologiczne odnotowywano u padłych na jersiniozę nutrii i zajęcy [28]. Odmiennie natomiast przebiegały objawy kliniczne u kota. Zwierzę to było nadpobudliwe, z wyraźnymi symptomami neurologicznymi, które doprowadziły do bardzo szybkiego zejścia śmiertelnego. Pierwotnie podejrzewano zatrucie chemiczne, dlatego też wykonano szereg badań toksykologicznych. Ponieważ nie stwierdzono zatrucia, przeprowadzono analizę bakteriologiczną poprzedzoną badaniem sekcyjnym. W narządach wewnętrznych odnotowano liczne ogniska martwicze; w posiewach uzyskano czystą kulturę *Y. pseudotuberculosis* [28]. W 1995 roku stwierdzono jersiniozę u źrebiąt z objawami ropnego zapalenia płuc i biegunką [2, 3, 5, 6, 23]. Był to pierwszy przypadek tej choroby w Polsce, rzadko odnotowywany na świecie u koni. Przebieg zakażenia był ostry, mimo antybiotykoterapii obserwowano zejścia śmiertelne. Wyizolowany od zwierząt padłych szczep *Y. pseudotuberculosis*, należący do serotypu O:1a, prezentował szereg cech chorobotwórczych. Wytwarzał ciepłochwiejną enterotoksynę LT, zawierał gen *inv*, wykazywał właściwości hydrofobowe, wapniozależny wzrost w temp. 37°C i zdolność do autoaglutynacji w wymienionej temperaturze, nie syntetyzował pyrazynamidazy w temp. 30°C i nie posiadał genu *yadA* [3, 25]. Odnotowano, iż immunostymulacja klaczy preparatem przygotowanym z *Propionibacterium acnes*, a następnie wakcynacja inaktywowaną szczepionką przygotowaną z wyizolowanego szczepu *Y. pseudotuberculosis*, skutecznie zapobiegła jersiniozie źrebiąt [6, 7]. Podobny system zapobiegania tej chorobie zastosowano wcześniej w hodowli szynszyli [10, 20].

4. Odzwierzęce zakażenia człowieka

Stwierdzono przypadek epidemii rodzinnej na tle *Y. pseudotuberculosis* w mieście Balcarce (prow. Buenos Aires). Źródłem zakażenia dwóch dziewczynek okazała się świnka morska kupiona w sklepie zoologicznym. Gryzoń był karmiony warzywami, które w surowym stanie spożyli rodzice, dziewczynki oraz służąca. Po dwóch miesiącach u wszystkich osób wystąpiła biegunka, bóle okolicy brzucha, uczucie rozbicia i osłabienia. W wyniku intensywnej terapii (sulfaguanidinum oraz mleko bizmutowe) objawy u ludzi ustąpiły, stwierdzono natomiast zachorowanie świnki morskiej: biegunkę, postępujące porażenie mięśni kończyn i zaburzenia w oddychaniu. Zwierzę padło; na sekcji stwierdzono *enterocolitis acuta*, *adenitis*

mesenterica, *pseudotuberculosis* oraz liczne drobne jasnoszare ogniska martwicze pod torebką wątroby. Badanie histopatologiczne wątroby wykazało, iż ich budowa przypomina gruzełki gruźlicze. Z wątroby oraz innych narządów wyizolowano szczep *Y. pseudotuberculosis*, wykazujący charakterystyczne właściwości biochemiczne dla tego gatunku. W wyniku badań serologicznych określono go jako serotyp 1. Ten sam szczep wyizolowano z kału jednej z dziewczynek. W związku z możliwym nosicielstwem *Y. pseudotuberculosis* u pozostałych członków rodziny zasugerowano przeprowadzenie antybiotykoterapii. Po określeniu wrażliwości na antybiotyki zastosowano terapię Bactrimem (trimetoprim-sulfametoksazol). Po dwóch tygodniach wykonano badania kontrolne kału wszystkich członków rodziny, nie stwierdzając obecności *Y. pseudotuberculosis*. Był to pierwszy przypadek epidemii rodzinnej na tle tego drobnoustroju w Argentynie oraz pierwsza izolacja *Y. pseudotuberculosis* w tym kraju [17, 18]. Po wysłaniu szczepu do profesora H.H. M o l l a r e t (Instytut Pasteura), otrzymano potwierdzenie rozpoznania [16]. Diagnostykę jersiniozy zwierząt w Argentynie realizowano w sposób planowy, obserwując faunę pampy i korzystając z dobrze wyposażonego laboratorium (projekt FAO). Wstępne wyniki dotyczące tych elementów i pierwszych badań opublikowano w czasopismach argentyńskich [13, 14, 15].

5. Charakterystyka szczepów

W wyniku jersiniozy różnych gatunków ssaków i ptaków wyosobniono wiele szczepów tego rodzaju bakterii. Dokładnej analizie fenotypowej i genotypowej (od 1999 roku) poddano 70 szczepów, w tym 10 wyizolowanych z gleby bądź wody. Stwierdzono, iż 62 szczepy (88,6%) należały do serotypu 1, 6 (8,6%) do serotypu 2; dwóch nie udało się oznaczyć serologicznie. Wymienione szczepy prezentowały cechy swoistości gatunkowej oraz chorobotwórczości, określone metodami fenotypowymi i genotypowymi (PCR-RFLP). Należy wymienić tutaj obecność genów: *ypm* (swoistość), *malF* (synteza permeazy maltozowej), *lacZ* (wytwarzanie β-galaktozydazy), *inv*, *yad* i niekiedy *ail* (inwazyjność). Nie zawierały natomiast genu *elt*, determinującego syntezę enterotoksyny ciepłochwiejnej, chociaż w teście odwróconej biernej aglutynacji lateksowej z reguły uzyskiwano rezultaty pozytywne. Ponadto reagowały pozytywnie w próbach autoaglutynacji, wapniozależności oraz „salt out" teście, dając negatywne reakcje na wytwarzanie pyrazynamidazy w temp. 30°C [3, 10, 19, 25]. Wszystkie szczepy bardzo intensywnie hydrolizowały mocznik, dzięki obecności ureazy; reakcja dodatnia była widoczna już po 2 godzinach inkubacji w temp. 37°C [23]. Mimo dodatniej reakcji ONPG na β-galaktozydazę nie fermentowały laktozy, co może świadczyć o braku enzymu permeazy. Sugestię tę potwierdzono serią badań nad genetyczną determinacją właściwości sacharolitycznych szczepów *Y. pseudotuberculosis* oraz *Escherichia coli*. Ustalono, iż szczepy pierwszego gatunku posiadają zdolność do syntetyzowania β-galaktozydazy, a nie wytwarzają permeazy β-galaktozydowej, odpowiedzialnej między innymi za transport laktozy do komórki bakteryjnej. Odnotowano, że dzieje się to mimo obecności w komórce genu *lacY* (determinującego syntezę permeazy), ale brak jest jego ekspresji. W podobny sposób zachowują się szczepy *Y. pestis* [26]. Stanowi to ważny element w diagnostyce (test ONPG dodatni, brak fermentacji laktozy). Ponadto zwrócono uwagę, iż dzięki metodzie PCR-RFLP istnieje możliwość różnicowania szczepów bakteryjnych na poziomie DNA, w obrębie genów *malF* i *lacY*, między gatunkami *Y. pseudotuberculosis* oraz *E. coli*, z jednoczesną determinacją genetyczną ich właściwości sacharolitycznych [26].

6. Podsumowanie

Jersinioza występuje najczęściej u dzikich, hodowlanych oraz laboratoryjnych gryzoni (wiskacze, szynszyle, świnki morskie), wywołując zmiany w przewodzie pokarmowym. Najczęściej atakowanym narządem jest wątroba; obserwuje się zapalenie, hepatomegalię (rzadziej splenohepatomegalię), liczne ogniska martwicze pod torebką tego narządu oraz na powierzchni nerek, śledziony, płuc i osierdzia. Nosicielami jersinii w przyrodzie są głównie polne myszy i inne drobne gryzonie. Jersinioza u gryzoni może występować w postaci enzootii. U zwierząt, u których choroba ta pojawia się rzadko, jej obraz kliniczny jest odmienny; u koni ma charakter ropnego zapalenia płuc, u kotowatych dochodzi do zaburzeń centralnego układu nerwowego, u małp patasów i koczkodanów zielonych objawy choroby i zmiany anatomopatologiczne są podobne do zaburzeń występujących u ludzi (stan zapalny jelit, silne przekrwienie krezkowych węzłów chłonnych, ogniska gruźliczopodobne w wątrobie). Z ptactwa hodowlanego najbardziej wrażliwa jest biała odmiana indyków. Choroba może mieć charakter odzwierzęcy, pojawiając się w formie epidemii rodzinnych. Diagnostyka laboratoryjna winna mieć charakter ściśle ukierunkowany.

Piśmiennictwo

1. Czernomysy-Furowicz D., Furowicz A.J.: Zakażenia pokarmowe wywołane przez *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis.* (w:) Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową, red. A. Boroń-Kaczmarska, A.J. Furowicz, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1999, s. 164–179

2. Czernomysy-Furowicz D.: An outbreak of foal yersiniosis in Poland – pathological and bacteriological examination. *Zabl. Bakt*. **287**, 542–546 (1997)
3. Czernomysy-Furowicz D., Furowicz A.J., Cieślewicz W.: Investigation of virulence determination of *Yersinia pseudotuberculosis* (7th International Congress on Yersinia – Nijmegen). *Nederlands Tijdschrift Voor Med. Mikrob.* **6**, 40 (1998)
4. Czernomysy-Furowicz D., Furowicz A.J., Perużyńska A.: Prevalence of *Yersinia pseudotuberculosis* in inland and see waters. *Med. Sci. J. Exp. Clin. Res.* 6 (suppl. 3), **137** (2000)
5. Czernomysy-Furowicz D., Furowicz A.J.: Elektroforeza białek osocza krwi ciężarnych klaczy z uwzględnieniem poziomu immunoglobulin i bakteriostatycznego wpływu transferyny na szczep *Y. pseudotuberculosis*. *Agric. Stetin Zootech*. **225**, 57–65 (2001)
6. Czernomysy-Furowicz D.: Efektywność immunostymulatora *P. acnes* oraz inaktywowanej pełnokomórkowej szczepionki w profilaktyce jersiniozy źrebiąt. Rozprawa habilitacyjna. Wyd. Naukowe AR Szczecin, 2003, s. 5–74
7. Czernomysy-Furowicz D., Furowicz A.J.: Obecność przeciwciał anty-*Yersinia pseudotuberculosis* w surowicy koni. Symp. Naukowe: Zoonozy – aktualne zagrożenia. Wyd. Pol. Tow. Mikrob., Warszawa, 2006, s. 53
8. Czyżewska I., Furowicz A.J.: Zjadliwość szczepów *Y. pseudotuberculosis* wyizolowanych ze środowiska zewnętrznego w kontekście zagrożenia dla człowieka. *Przeg. Epidem.* **57**, 263–270 (2003)
9. Czyżewska I.: Klasyczne metody bakteriologiczne oraz test PCR w diagnostyce i określaniu toksyczności szczepów *Y. pseudotuberculosis* wyizolowanych ze środowiska zewnętrznego. Rozprawa doktorska, AR Szczecin, Szczecin, 2004
10. Emirsajłow-Zalewska W., Furowicz A.J., Aleksić S.: Evaluation of pathogenicity determinants of *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from chinchillas from Western Pomerania area. *Adv. Agric. Sci.* **5**, 19–22 (1996)
11. Furowicz A.J., Steffen J.: Enzoocja gruźlicy rzekomej w stadzie indyków. *Medycyna Wet.* **20**, 596–600 (1964)
12. Furowicz A.J., Steffen J.: Próba identyfikacji biochemicznej szczepów *Pasteurella pseudotuberculosis* izolowanych od zwierząt na terenie woj. katowickiego. *Medycyna Wet.* **22**, 660–663 (1966)
13. Furowicz A.J., Zamora A., Terzolo H.R.: Primeros estudios e investigaciones de la actuacion de las bacterias *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica* en los animales. *Gaceta Vet.* (*Buenos Aires*), **37**, 300–305 (1975)
14. Furowicz A.J., Terzolo H.R.: Las enfermedades de los animales producidas por las bacterias del género *Yersinia*. *Boletin Técnico E.E.A.R. Balcarce* (*Argentina*), **10**, 5–9 (1975)
15. Furowicz A.J., Pereira J.J., Terzolo H.R.: Investigationes sobre la incidencia de las bacterias *Yersinia rodentium* e *Y. enterocolitica* (*Pasteurella* X). *Revista de Med. Vet.* **58**, 325–328 (1977)
16. Furowicz A.J., Bagnat E., Terzolo H.R., Crenovich H., Pereira J.J.: Une épidémie familiale ā *Yersinia pseudotuberculosis*. *Médecine et Malladies Infectieuses* (*Paris*), **9**, 426–427 (1977)
17. Furowicz A.J., Terzolo H.R., Bagnat E., Pessacq A., Zoratti de Verona A.: Przypadek małej epidemii rodzinnej w Argentynie wywołanej przez *Yersinia pseudotuberculosis*. *Przeg. Epidem.* **32**, 23–25 (1978)
18. Furowicz A.J., Terzolo H.R., Pessacq A., Zoratti de Verona A.: Primer aislamiento en la Argentina de *Yersinia pseudotuberculosis* de un cabayo y de materia fecal humana. *Medicina* (*Buenos Aires*), **38**, 45–50 (1978)
19. Furowicz A.J., Czernomysy-Furowicz D., Kowalczewska M.: Mechanizmy zjadliwości pał. *Yersinia* związane z elementami ściany komórkowej. *Medycyna Wet.* **51**, 581–584 (1995)
20. Furowicz A.J., Czernomysy-Furowicz D., Misiura M., Kowalczewska M.: Enterotoksyczny szczep *Yersinia pseudotuberculosis* przyczyną jersiniozy szynszyli. *Medycyna Wet.* **52**, 116–119 (1996)
21. Furowicz A.J., Czernomysy-Furowicz D.: *Yersinia pseudotuberculosis* infections in animals. *Adv. Agric. Sci.* **5**, 5–8 (1996)
22. Furowicz A.J., Emirsajłow-Zalewska W., Czernomysy-Furowicz D.: Mechanizmy zakażenia *Yersinia pseudotuberculosis* ze specjalnym uwzględnieniem procesu inwazji. *Medycyna Wet.* **53**, 81–83 (1997)
23. Furowicz A.J., Karakulska J., Perużyńska A.: Bakteryjna ureaza – wskaźnik diagnostyczny i element patogenności drobnoustrojów jelitowych. *Medycyna Wet.* **60**, 119–123 (2004)
24. Furowicz A.J., Ferlas M., Czernomysy-Furowicz D.: Jersinioza zwierząt w świetle własnych obserwacji. Symp. Naukowe: Zoonozy – aktualne zagrożenia. Wyd. Pol. Tow. Mikrob., Warszawa, 2006, s. 55.
25. Gackowska I., Furowicz A.J., Czernomysy-Furowicz D., Jakubczak A.: Fenotypowa i genotypowa analiza właściwości chorobotwórczych szczepów *Yersinia pseudotuberculosis* oraz *Y. enterocolitica*. *Medycyna Wet.* **58**, 303–305 (2002)
26. Mizielińska M.: Badania wybranych cech biologicznych szczepów *Yersinia pseudotuberculosis* oraz *E. coli* ze specjalnym uwzględnieniem genetycznej determinacji ich właściwości sacharolitycznych. Rozprawa doktorska. AR Szczecin, Szczecin 2005
27. Steffen J., Furowicz A.J., Zieliński Z.: Enzootia gruźlicy rzekomej (*pseudotuberculosis*) u małp patasów (*Erythrocebus patas-Schreb*) oraz koczkodanów zielonych (*Cercopithecus callitriche*) w Śląskim Ogrodzie Zoologicznym w Katowicach. *Medycyna Wet.* **22**, 270–273 (1966)
28. Steffen J., Furowicz A.J.: *Pasteurella pseudotuberculosis* u nutrii, zajęcy, małp oraz indyków. Biuletyn III Zjazdu PTNW, Warszawa, 1966, s. 297–298.
29. Zaremba M.L., Borowski J., Bakteriologia lekarska. (w:) Mikrobiologia lekarska, red. M.L. Zaremba, J. Borowski, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1997, s. 198–202.

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 287–291
http://www.pm.microbiology.pl

ROLA ZWIERZĄT JAKO REZERWUARU GIARDIOZY U LUDZI – ZOONOTYCZNY POTENCJAŁ *GIARDIA INTESTINALIS*

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Wojciech Zygner[1]*, Halina Wędrychowicz[1,2]

[1] Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, tel. (22) 593 60 44
[2] Polska Akademia Nauk, Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa
* Autor korespondencyjny: e-mail: wojciechzygner@o2.pl

1. Wstęp. 2. Występowanie giardiozy u ludzi na świecie i w Polsce. 3. Występowanie giardiozy u zwierząt na świecie i w Polsce. 4. Podsumowanie

Role of animals as a reservoir of human giardiasis – zoonotic potential of *Giardia intestinalis*

Abstract: Giardiasis is a protozoan disease of humans and animals caused by *Giardia intestinalis* (syn. *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*). In developing countries nearly 100% of children acquire *G. intestinalis* infection but in the United States only 0,004% of children per year suffer from giardiasis. In Poland, the prevalence rate is 0–41,4% and depends on age, hygenic standards and economic conditions. *G. intestinalis* isolates can be divided into 7 genotypes. Human genotypes (assemblage A and B) can infect people, dogs, cats, horses, cattle and sheep. The other 5 genotypes (assemblage C-G) infect only animals. The question is: do animals play a role as a reservoir of human giardiasis? It seems that they can be a reservoir of giardiasis. In Italy, 66.7% of isolates from faeces of cattle were identified as assemblage A and 20.8% as assemblage B. In Germany, 87.3% of isolates from faeces of dogs were identified as assemblage A. It seems that in these countries dogs and cattle can be the reservoir of *G. intestinalis* infection. In Poland, there is a lack of molecular characterization of detected isolates both from humans and animals. It is possible that in Poland animals can be a reservoir of human giardiasis but we do not know which species.

1. Introduction. 2. Occurrence of human giardiasis in the world and Poland. 3. Occurrence of giardiasis in animals in the world and Poland. 4. Summary

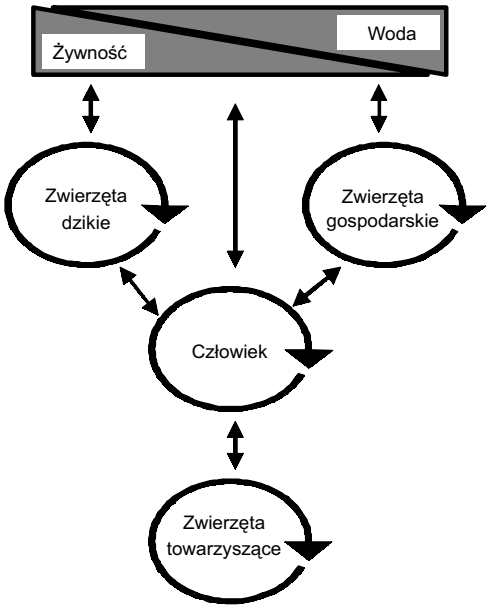
Słowa kluczowe: *Giardia intestinalis*, rezerwuar giardiozy u ludzi, zwierzęta
Key words: *Giardia intestinalis*, reservoir of human giardiasis, animals

1. Wstęp

Giardioza jest chorobą ludzi i zwierząt powodowaną przez pierwotniaka *Giardia intestinalis* (syn. *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*). Pasożyt ten należy do rodziny *Diplomonadidae*, rzędu *Diplomonadorida*, podtypu *Mastigophora*, typu *Sarcomastigophora* [1, 42]. Inwazja *G. intestinalis* jest jedną z przyczyn występowania biegunki zarówno u ludzi, jak i u zwierząt na całym świecie. Szacuje się, iż rocznie dochodzi do około 280 milionów zarażeń u ludzi. Żywicielem są kozy, owce, bydło, świnie, konie, psy, koty, szczury, szynszyle, świnki morskie, małpy, bobry oraz człowiek i inne naczelne, a prawdopodobnie wszystkie ssaki [1, 42, 43]. Gatunek *G. intestinalis* dzieli się na 7 grup Mayrhofera oznaczonych literami od A do G. Ponadto grupa A dzieli się na dwie podgrupy określane jako A-1 (nazywana również szczepem polskim) i A-2. Spośród siedmiu grup Mayrhofera jedynie grupa A (zarówno A-1, jak i A-2) i grupa B (nazywana również szczepem belgijskim) powodują inwazje u ludzi [1]. W niniejszym opracowaniu grupy Mayrhofera, zgodnie z nomenklaturą proponowaną przez A d a m a [1], nazywane są genotypami.

W cyklu rozwojowym *G. intestinalis* występuje jeden żywiciel. Zarażenie następuje drogą pokarmową. Stadium inwazyjnym są cysty, które w wilgotnym środowisku zewnętrznym mogą przeżyć od kilku do kilkunastu miesięcy [24, 49]. Cysty *G. intestinalis* o wymiarach 8–12/7–10 μm są owalne, posiadają 4 jądra [42]. W żołądku pod wpływem kwasu solnego dochodzi do uwolnienia z cysty ekscyzoitu (ekscystacja), który po podziale komórkowym daje potomne trofozoity [7]. Trofozoity są stadium rozwojowym zasiedlającym dwunastnicę i początkowy odcinek jelita cienkiego. Za pomocą tarczy przyssawkowej przylegają do błony śluzowej. Poruszanie się w świetle jelita umożliwia trofozoitom obecność czterech par wici [1, 49]. Trofozoity kształtem przypominają łzę o wymiarach 12–15/5–9 μm [42]. Kolejnym etapem w cyklu rozwojowym jest podział trofozoitów na trofozoity potomne, które kolonizują kolejne odcinki błony śluzowej jelita cienkiego. Część potomnych trofozoitów nie zasiedla następnych fragmentów błony śluzowej, lecz w procesie encystacji formuje cysty, które wraz z kałem wydalane są do środowiska zewnętrznego [1].

Inwazja *G. intestinalis* rozprzestrzenia się bezpośrednio pomiędzy ludźmi i zwierzętami drogą fekalno-oralną bądź też za pośrednictwem wody i sporadycznie żywności skażonej cystami (Rys. 1). Największe znaczenie w rozprzestrzenianiu się inwazji wśród ludzi odgrywa spożywanie wody zawierającej cysty pierwotniaka



Rys. 1. Diagram przedstawiający cykle rozprzestrzeniania inwazji *Giardia intestinalis* [18]

[18, 49]. Stwierdzono, iż chlorowanie stosowane do uzdatniania wody wodociągowej nie zabija cyst. Występowanie cyst stwierdzano zarówno w rzekach, jeziorach, wodzie źródlanej i morskiej, jak i w wodzie kranowej, a nawet w butelkowanej wodzie pitnej [13, 16, 21, 48]. Dotychczas nie określono jednoznacznie, jaką rolę odgrywają zwierzęta. Wiele badań prowadzonych na świecie wskazuje, iż wyższy odsetek zarażeń wśród ludzi występuje w rejonach, w których występuje wyższa ekstensywność inwazji wśród zwierząt. Zjawisko to jednak dotyczy krajów bądź społeczeństw i grup ludzi, o niskich standardach higienicznych [5, 11, 18, 26, 34]. Ponadto stwierdzono występowanie tych samych genotypów u ludzi i zwierząt towarzyszących zamieszkujących na tych samych terenach [5, 43].

Występowanie u zwierząt genotypów *G. intestinalis* groźnych dla człowieka pozwala przypuszczać, iż możliwe jest zarażenie człowieka cystami pochodzącymi od zwierząt bezpośrednio drogą fekalno-oralną bądź za pośrednictwem wody zanieczyszczonej odchodami zwierząt. Można również przypuszczać, że zwierzęta mogą ulegać zarażeniu cystami obecnymi w kale człowieka. Przeprowadzone zarażenia eksperymentalne psów oraz człowieka potwierdziły te przypuszczenia [27, 37].

2. Występowanie giardiozy u ludzi na świecie i w Polsce

Na świecie odsetek zarażonych ludzi wynosi od 0,004% do blisko 100%. Najwyższa prewalencja dotyczy dzieci w wieku poniżej 2 lat w krajach rozwijających się [19]. W znacznym stopniu zależy od czynników takich jak: nawyki higieniczne, dieta, jakość dostępnej wody pitnej, zagęszczenie ludności na danym terenie, metody stosowane do nawożenia upraw rolnych oraz przedział wiekowy badanej grupy. Niskie standardy higieniczne, picie surowej wody kranowej oraz połykanie wody podczas kąpieli w sztucznych i naturalnych zbiornikach wodnych, jak również spożywanie surowych warzyw i owoców (zwłaszcza sałaty) w znacznym stopniu zwiększają ryzyko zarażenia giardiozą. Szacuje się, iż ryzyko zarażenia wzrasta również u osób wyjeżdżających do krajów o niskich standardach higienicznych, a odsetek osób zarażonych powracających z takich podróży może przekraczać 50% [10, 11, 19].

Odsetek zarażonych ludzi w Afryce, Ameryce Północnej, Europie i Australii średnio wynosi 1,2–32% [30]. W Nowej Zelandii średnia ekstensywność inwazji wynosi 0,05%, a najwyższy odsetek zarażeń stwierdzany jest w grupach wiekowych 1–4 oraz 30–39 lat [17]. W Brazylii stwierdzono bardzo wysoką ekstensywność inwazji *G. intestinalis* (27,7%) u dzieci w przedziale wiekowym od 9 miesięcy do 4 lat. U osób dorosłych była znacznie niższa i wynosiła 1,7% [47]. W krajach europejskich na ogół odsetek zarażonych ludzi jest niższy, wyjątek stanowi Albania i Turcja, gdzie inwazję *G. intestinalis* wykrywano u 6,1–17,6% badanych [8, 31]. U dzieci w Polsce w latach 1992–1993 pierwotniaka stwierdzano u 1,56%, w latach 1997–1998 u 1,02%, natomiast w latach 2002–2003 odsetek osób zarażonych obniżył się do 0,69% [9]. Najwyższy odsetek zarażonych dzieci w okresie 2002–2003 odnotowano w województwie Wielkopolskim, gdzie zarażonych było 70 spośród 3509 (1,99%) badanych, najniższy zaś w województwie Opolskim gdzie na 824 badane dzieci nie stwierdzono ani jednego przypadku giardiozy. W województwie tym badano jednak wyłącznie dzieci z miast, natomiast najniższy odsetek zarażeń, gdzie badano zarówno dzieci z miast, jak i wsi stwierdzono w województwie Podkarpackim, gdzie na 2292 badanych inwazję stwierdzono u jednego dziecka (0,04%) [9].

Analiza molekularna DNA pierwotniaka *G. intestinalis* stwierdzanego u ludzi wykazała, iż za większość inwazji odpowiada genotyp B. Na stwierdzonych 1438 przypadków giardiozy u ludzi we Włoszech, Wielkiej Brytanii, Holandii, USA, Australii, Chinach, Korei, Laosie, Indiach, Peru, Ugandzie i Turcji, 986 (69%) spowodowanych było przez genotyp B, 370 (26%) przez genotyp A, natomiast pozostałe 6% inwazji były to inwazje mieszane powodowane przez obydwa genotypy [11].

3. Występowanie giardiozy u zwierząt na świecie i w Polsce

Na świecie ekstensywność inwazji u zwierząt zależnie od gatunku wynosi 0,6–100% (Tabela I). Najwyższy odsetek występuje u nornicy i piżmaka w Ameryce Północnej [30].

Tabela I

Odsetek zarażonych żywicieli *G. intestinalis* na świecie [30]

Żywiciel	Odsetek osobników zarażonych w populacji	Kontynent/kraj
Pies	1,6–53%	Azja, Australia, Europa, Ameryka Północna, Środkowa, Południowa
Kot	0,6–80%	Australia, Europa, Japonia, Nowa Zelandia, USA
Owca	7–35,6%	Meksyk, Kanada
Bydło	10,3–27,7%	Ameryka Północna i Środkowa, Szwajcaria
Świnia	3%	Meksyk
Szczur	14,7%	Hiszpania, Granada
Bóbr	9,2–18%	USA
Piżmak	36,6–100%	USA
Nornica	33–98,8%	Kanada
Człowiek	1,2–32%	Afryka, Australia, Europa, Ameryka Północna

Dotychczas opublikowano zaledwie kilka prac dotyczących występowania giardiozy u zwierząt w Polsce. Najwyższy odsetek zarażeń *Giardia* sp. stwierdzono u dzikich gryzoni takich jak nornica ruda i nornik zwyczajny na terenach Polski północno-wschodniej; wynosił on odpowiednio 93,9% oraz 96,3% [4]. Inwazję *Giardia* sp. w północno-wschodniej części naszego kraju stwierdzano również u takich dzikich zwierząt jak mysz leśna, wilk, bóbr europejski, żubr europejski, sarna oraz jeleń europejski, u których ekstensywność inwazji wynosiła odpowiednio 48,3%, 45,5%, 7,7%, 7,5%, 4,5% oraz 1,7% [4, 22, 32]. W Wielkopolsce natomiast przeprowadzono badania nad występowaniem cyst *Giardia* sp. w kale cieląt. W pracy tej wykryto inwazję u 14% badanych osobników [6]. Najwięcej badań nad występowaniem inwazji *Giardia* sp. u zwierząt w Polsce przeprowadzono u psów. Ekstensywność inwazji tego pierwotniaka u psów wynosiła od 10–35,9% [3, 15, 50].

Przeprowadzona analiza molekularna DNA wykrywanych u zwierząt pierwotniaków z gatunku *G. intestinalis* pozwala porównać ekstensywność inwazji u zwierząt i ludzi powodowanych przez te same genotypy. Zależnie od regionu, w którym przeprowadzono badania, stwierdzano różny odsetek poszczególnych genotypów *G. intestinalis* u zarażonych osobników. Udział poszczególnych genotypów *G. intestinalis* odpowiedzialnych za inwazje u zwierząt przedstawiono

Tabela II

Udział poszczególnych genotypów *Giardia intestinalis* odpowiedzialnych za inwazje u zwierząt

Gatunek zwierzęcia	Procentowy udział poszczególnych genotypów w inwazji (%)	Kraj	Piśmiennictwo
Pies	A (17,14), C (11,43), D (71,43)	Polska	[50]
	A (87,3), C (9,1), D (3,6)	Niemcy	[25]
	A (33,3), C (4,8), D (61,9)	Włochy	[23]
	C (25,9), D (74,1)	Brazylia	[40]
	A (70,8), C (4,2), D (25)	Japonia	[20]
Kot	A (42,1), F (57,9)	Brazylia	[40]
	F (100)	Japonia	[20]
Koń	A (40), B (60)	USA, Australia	[44]
Krowa	A (2,4), B (58,3), E (41,7–97,6)	Kanada	[2, 12]
	A (6–9), E (91–94)	USA	[45, 46]
	A (20), E (80)	Japonia	[20]
	A (20), E (80)	Brazylia	[40]
	A (66,7), B (20,8), E (12,5)	Włochy	[23]
	A (22,2), E (77,8)	Australia	[28]
	A (14,3), B (7,1), E (78,6)	Portugalia	[29]
Owca	A (100)	Włochy	[14]
	A (23,9), E (76,1)	Australia	[38]
	A (8,3), E (91,7)	USA	[39]

w tabeli II. Dla uproszczenie inwazje mieszane powodowane przez dwa genotypy, z których jeden jest patogenny dla człowieka zaliczono do genotypu o potencjale zoonotycznym (odpowiednio A lub B). Przedstawione w tabeli II dane procentowe znacznie różnią się od siebie. Różnice te wynikać mogą z różnych standardów higienicznych w poszczególnych krajach oraz różnych warunków sanitarnych w poszczególnych hodowlach zwierząt. Ponadto na wysoki odsetek genotypu A lub B u zwierząt wpływać może zagęszczenie zwierząt na danym terenie, bliski kontakt z człowiekiem oraz niewielka grupa badana np. w przypadku stwierdzenia we Włoszech u 100% zarażonych owiec genotypu A. Należy podkreślić, iż ekstensywność inwazji w tej populacji wynosiła zaledwie 1,5% [14]. Najwyższy odsetek zarażeń genotypem A stwierdzano u psów w Niemczech i Japonii oraz u krów we Włoszech, natomiast znaczący odsetek zarażeń powodowany przez genotyp B obserwowano u krów w Kanadzie oraz u koni w USA i Australii [12, 20, 23, 25, 44]. W krajach tych zwierzęta takie jak psy, konie i domowe przeżuwacze zarażone patogennymi dla człowieka genotypami stanowić mogą rezerwuar inwazji u ludzi. Z drugiej strony w Brazylii nie stwierdzono u psów genotypu A bądź B, natomiast stwierdzono wysoki odsetek występowania genotypu A u kotów [40]. Obserwacje te wskazywać mogą, iż w różnych regionach inne gatunki zwierząt stanowić mogą rezerwuar inwazji. Nie można również wykluczyć, iż to człowiek stanowić może rezerwuar giardiozy dla zwierząt.

4. Podsumowanie

W Polsce giardioza stwierdzana jest u 0–41,4% ludzi, zależnie od grupy wiekowej, warunków sanitarnych i higienicznych, materialnych i innych [33, 35, 41]. Najwyższy odsetek obserwowano u dzieci w domach dziecka [33]. Obserwacja ta wskazywać może, iż głównym rezerwuarem giardiozy człowieka jest człowiek. Możliwe jest, iż zwierzęta nie odgrywają znaczącej roli jako rezerwuaru tej choroby w Polsce. Wskazywać na to może z jednej strony w większości badań fakt znacznie wyższej ekstensywności inwazji u zwierząt niż u ludzi, z drugiej zaś strony umiarkowanie niski odsetek zarażeń u zwierząt powodowanych przez genotypy patogenne dla człowieka. Odpowiedź na pytanie czy w Polsce zwierzęta stanowią rezerwuar giardiozy człowieka mogą dać jedynie wyniki badań molekularnych i genotypowania izolatów *G. intestinalis* uzyskanych z próbek dodatnich kału zwierząt. Większość prac dotyczących występowania *G. intestinalis* u zwierząt w Polsce opartych było na badaniach mikroskopowych oraz testach immunologicznych. Dane uzyskane w wyniku przeprowadzenia tego typu badań są bardzo pomocne i pozwalają określić skalę problemu występowania giardiozy u zwierząt, jednak są niewystarczające do określenia potencjalnego ryzyka, jakie niesie ze sobą kontakt bezpośredni bądź pośredni z zarażonymi zwierzętami. Na zakończenie warto również dodać, iż zaobserwowano dodatnią korelację nasilenia objawów klinicznych giardiozy u ludzi z inwazją powodowaną przez genotyp A [36]. W związku z tym określenie genotypów *G. intestinalis* występujących w Polsce u ludzi i zwierząt pozwolić może nie tylko określić ryzyko, jakie niesie ze sobą kontakt ze zwierzętami, ale również przewidywać potencjalne nasilenie objawów choroby w przypadku zarażeń genotypami pochodzącymi od zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Adam R.D.: Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 447–475 (2001)
2. Appelbee A.J., Frederick L.M., Heitman T.L., Olson M.E.: Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Vet. Parasitol.* **112**, 289–294 (2003)
3. Bajer A., Bednarska M.: Zarażenia *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. u psów zaprzęgowych. *Med. Wet.* **63**, 681–687 (2007)
4. Bajer A., Bednarska M., Pawełczyk A., Behnke J.M., Gilbert F.S., Siński E.: Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology*, **125**, 21–34 (2002)
5. Barr S.C.: Giardiasis. (w:) Infectious Diseases of the Dog and Cat, red. C.E. Greene, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2006, s. 736–742
6. Bednarska M., Bajer A., Siński E.: Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Ann. Agric. Environ. Med.* **5**, 135–138 (1998)
7. Bernander R., Palm J.E., Svard S.G.: Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol.* **3**, 55–62 (2001)
8. Berrilli F., Di Cave D., D'Orazi C., Orecchia P., Xhelilaj L., Bejko D., Caca P., Bebeci D., Cenko F., Donia D., Divizia M.: Prevalence and genotyping of human isolates of *Giardia duodenalis* from Albania. *Parasitol. Int.* **55**, 295–297 (2006)
9. Bitkowska E., Wnukowska N., Wojtyniak B., Dzbeński T.H.: Analiza występowania pasożytów jelitowych u dzieci klas pierwszych w roku szkolnym 2002/2003. *Przegl. Epid.* **58**, 295–302 (2004)
10. Caccio S.M., De Giacomo M., Auliciano F.A., Pozio E.: *Giardia* Cysts in Wastewater Treatment Plants in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3393–3398 (2003)
11. Caccio S.M., Thompson R.C.A., McLauchlinn J., Smith H.V.: Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* **21**, 430–437 (2005)
12. Coklin T., Farber J., Parrington L., Dixon B.: Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet. Parasitol.* **150**, 297–305 (2007)
13. Fayer R., Dubey J.P., Lindsay D.S.: Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol.* **20**, 531–536 (2004)
14. Giangaspero A., Paoletti B., Iorio R., Traversa D.: Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy. *Parasitol. Res.* **96**, 32–37 (2005)

15. Gundłach J.L., Sadzikowski A.B., Studzińska M.B., Tomczuk K.: Inwazje *Giardia* spp. i *Cryptosporidium* spp. u psów i kotów. *Med. Wet.* **60**, 1202–1203 (2004)
16. Hashimoto A., Kunikane S., Hirata T.: Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. *Wat. Res.* **36**, 519–526 (2002)
17. Hoque M.E., Hope V.T., Scragg R., Kjellstrom T., Lay-Yee R.: Nappy handling and risk of giardiasis. *Lancet*, **357**, 1017–1018 (2001)
18. Hunter P.R., Thompson R.C.A.: The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* **35**, 1181–1190 (2005)
19. Heresi G.P., Murphy J.R., Cleary T.G.: Giardiasis. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **11**, 189–195, (2000)
20. Itagaki T., Kinoshita S., Aoki M., Itoh N., Saeki H., Sato N., Uetsuki J., Izumiyama S., Yagita K., Endo T.: Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamete dehydrogenase gene sequencing. *Vet. Parasitol.* **133**, 283–287 (2005)
21. Karanis P., Sotiriadou I., Kartashev V., Kourenti C., Tsvetkova N., Stojanova K.: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ. Res.* **102**, 260–271 (2006)
22. Kloch A., Bednarska M., Bajer A.: Intestinal macro- and microparasites of wolves (*Canis lupus* L.) from north-eastern Poland recovered by coprological study. *Ann. Agric. Environ. Med.* **12**, 237–245 (2005)
23. Lalle M., Pozio E., Capelli G., Bruschi F., Crotti D., Caccio S.M: Genetic heterogeneity at the β-giardin locus among human and animals isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.* **35**, 207–213 (2005)
24. Lane S., Lloyd D.: Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**, 123–147 (2002)
25. Leonhard S., Pfister K., Beelitz P., Wielinga C., Thompson R.C.A.: The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet. Parasitol.* **150**, 33–38 (2007)
26. Macpherson C.N.L.: Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **35**, 1319–1331 (2005)
27. Majewska A.C.: Successful experimental infections of a human volunteer and Mongolian gerbils with *Giardia* of animal origin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**, 360–362 (1994)
28. McCarthy S., Ng J., Gordon C., Miller R., Wyber A., Ryan U.M.: Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in animals in irrigation catchments in the southwest of Australia. *Exp. Parasitol.* **118**, 596–599 (2008)
29. Mendonca C., Almeida A., Castro A., de Lurdes Delago M., Soares S., da Costa J.M.C., Canada N.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet. Parasitol.* **147**, 47–50 (2007)
30. Monis P.T., Thompson R.C.A.: *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect. Genet. Evol.* **3**, 233–244 (2003)
31. Okyay P., Ertug S., Gultekin B., Onen O., Beser E.: Intestinal parasites prevalence and related factors in school children, a western city sample-Turkey. *BMC Public Health*, **4**: 64 (2004) doi:10.1186/1471-2458-4-64
32. Paziewska A., Bednarska M., Niewęgłowski H., Karbowiak G., Bajer A.: Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in selected species of protected and game mammals from north-eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **14**, 265–270 (2007)
33. Pikiewicz-Koch A.: Częstość występowania *Lamblia intestinalis* w wybranych środowiskach dziecięcych. *Przegl. Epid.* **53**, 339–343 (1999)
34. Ponce-Macotela M., Peralta-Abarca G.E., Martinez-Gordillo M.N.: *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: Prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Vet. Parasitol.* **131**, 1–4 (2005)
35. Ramisz A., Królikowska A., Balicka-Ramisz A.: Epidemiologiczne badania nad giardiozą u mieszkańców Szczecina. *Wiad. Parazyt.* **45**, 69–74 (1999)
36. Read C., Walters J., Robertson I.D., Thompson R.C.A.: Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int. J. Parasitol.* **32**, 229–231 (2002)
37. Rosa L.A.G., Gomes M.A., Mundim A.V., Mundim M.J.S., Pozzer E.L., Faria E.S.M., Viana J.C., Cury M.C.: Infection of dogs by experimental inoculation with human isolates of *Giardia duodenalis*: Clinical and laboratory manifestations. *Vet. Parasitol.* **145**, 37–44 (2007)
38. Ryan U.M., Bath C., Robertson I., Read C., Elliot A., Mcinnes L., Traub R., Besier B.: Sheep May Not Be an Important Zoonotic Reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* Parasites. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4992–4997 (2005)
39. Santin M., Trout J.M., Fayer R.: Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet. Parasitol.* **146**, 17–24 (2007)
40. Souza S.L.P., Gennari S.M., Richtzenhain L.J., Pena H.F.J., Funada M.R., Cortez A., Gregori F., Soares R.M.: Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats, and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) codnig gene. *Vet. Parasitol.* **149**, 258–264 (2007)
41. Spausta G., Gorczyńska D., Ciarkowska J., Wiczkowski A., Krzanowska E., Gawron K.: Występowanie pasożytów człowieka w wybranych populacjach na przykładzie badań przeprowadzonych w Śląskiej Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epiedmiologicznej. *Wiad. Parazyt.* **51**, 29–34 (2005)
42. Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L.: Veterinary Parasitology. Blackwell Publ., Oxford 2007
43. Thompson R.C.A.: The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* **126**, 15–35 (2004)
44. Traub R., Wade S., Read C., Thompson A., Mohammed H.: Molecular characterisation of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses. *Vet. Parasitol.* **130**, 317–321 (2005)
45. Trout J.M., Santin M., Fayer R.: Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. *Vet. Parasitol.* **147**, 205–209 (2007)
46. Trout J.M., Santin M., Greiner E.C., Fayer R.: Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in 1–2 year old dairy cattle. *Vet. Parasitol.* **140**, 217–222 (2006)
47. Volotao A.C., Costa-MacedoL.M., Haddad F.S.M., Brandao A., Peralta J.M., Fernandes O.: Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β-giardin gene: A phylogenetic analysis. *Acta Trop.* **102**, 10–19 (2007)
48. Wallis P.M., Erlandsen S.L., Isaac-Renton J.L., Olson M.E., Robertson W.J., van Keulen H.: Prevalence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and Characterization of *Giardia* spp. Isolated from Drinking Water in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2789–2797 (1996)
49. Wolfe M.S.: Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 93–100 (1992)
50. Zygner W., Jaros D., Skowrońska M., Bogdanowicz-Kamirska M., Wędrychowicz H.: Występowanie *Giardia intestinalis* u psów domowych w Warszawie. *Wiad. Parazyt.* **52**, 311–315 (2006)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 293–297
http://www.pm.microbiology.pl

BIOLOGIA KLESZCZY WŁAŚCIWYCH JAKO WEKTORA CHORÓB ZAKAŹNYCH I PASOŻYTNICZYCH

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Wojciech Zygner[1]*, Halina Wędrychowicz[1,2]

[1] Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, tel. (22) 593 60 44
[2] Polska Akademia Nauk, Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa
* Autor korespondencyjny: e-mail: wojciechzygner@o2.pl

1. Wstęp. 2. Cykle rozwojowe. 3. Żerowanie kleszczy właściwych. 4. Mechanizm pobierania pokarmu. 5. Immunomodulujące działanie białek obecnych w ślinie kleszczy. 6. Inne czynniki wpływające na przenoszenie chorób przez kleszcze właściwe. 7. Podsumowanie

Ixodid ticksas vectors of infectious and parasitic diseases

Abstract: Ixodid ticks are blood-feeding ectoparsites of humans and animals. They are vectors of a broad range of viral, rickettsial, bacterial and protozoan diseases and, in fact, they play a significant role in the transmission of vector-borne diseases. Then results mainly from the biology of ticks belonging to the *Ixodidae* family. The life cycle and a broad spectrum of hosts of three-host ticks, the mechanism of blood-feeding and the immunomodulatory effect of the tick saliva play the most important role in biology of ixodid ticks as vectors of infectious and parasitic diseases. These factors enhance the risk of tick-born pathogen transmission and allow to persist natural focuses of tick-borne diseases of livestock, wild and companion animals, and humans.

1. Introduction. 2. Life cycles. 3. Host-seeking behaviour and blood-feeding of ixodid ticks. 4. Mechanism of blood-feeding. 5. Immunomodulatory effect of proteins present in the tick saliva. 6. Other factors influencing the transmission of diseases by ixodid ticks 7. Summary

Słowa kluczowe: biologia, kleszcze właściwe, przenoszenie choroby, wektor choroby
Key words: biology, ixodid ticks, transmission of a disease, vector of a disease

1. Wstęp

Większość krwiopijnych pasożytów zewnętrznych kręgowców lądowych należy do dwóch gromad typu *Arthropoda* (stawonogi), takich jak owady (*Insecta*) i pajęczaki (*Arachnida*) [20]. Część z nich odgrywa rolę wektorów w przenoszeniu chorób zakaźnych i pasożytniczych o dużym znaczeniu jak np. ćmianki będące wektorami pierwotniaków z rodzaju *Leishmania* czy też komary przenoszące zarodźce malarii [5]. Największą jednak liczbę chorób zakaźnych i pasożytniczych o dużym znaczeniu medycznym przenoszą pajęczaki z podrzędu *Ixodida* (kleszcze). Do tego podrzędu należą trzy rodziny takie jak: *Argasidae*, *Ixodidae* oraz *Nuttalliellidae*. W obrębie kleszczy największe znaczenie w przenoszeniu chorób transmisyjnych odgrywają kleszcze z rodziny *Ixodidae* (kleszcze właściwe) [17, 20].

Kleszcze z rodziny *Ixodidae* odgrywają szczególną rolę w podtrzymywaniu naturalnych ognisk chorób transmisyjnych ludzi i zwierząt. Stanowią one zarówno rezerwuar, jak i są wektorami wielu chorób wirusowych, bakteryjnych i pierwotniaczych. Rodzina *Ixodidae* dzieli się na 5 podrodzin: *Ixodinae*, *Amblyomminae*, *Haemophysalinae*, *Hyalomminae* oraz *Rhipicephalinae*. Do rodziny tej należy 13 rodzajów mieszczących w sobie około 640 gatunków kleszczy [22]. Przedstawiciele rodziny *Ixodidae* występują we wszystkich środowiskach lądowych od okolic podbiegunowych po strefę międzyzwrotnikową. Szczególna zdolność kleszczy właściwych do przenoszenia chorób oraz podtrzymywania ich naturalnych ognisk występowania wynika w znacznym stopniu z ich biologii [23]. Do czynników biologicznych mających znaczenie w przenoszeniu chorób transmisyjnych przez kleszcze i utrzymywania ich ognisk należą: cykl rozwojowy, żerowanie i sposób pobierania pokarmu, oraz długi czas życia kleszczy. Ponadto, istotne znaczenie ma również immunomodulujące działanie białek zawartych w ślinie kleszcza.

2. Cykle rozwojowe

W cyklu rozwojowym kleszczy wyróżnia się 4 stadia takie jak: jajo, larwa, nimfa i postać dorosła. Istnieje ścisła zależność pomiędzy linieniem stadiów młodocianych oraz składaniem jaj przez samice, a żerowaniem. Przekształcenie jednego aktywnego stadium w kolejne oraz złożenie jaj przez samice możliwe jest jedynie po pobraniu pokarmu. Każde z aktywnych stadiów rozwojowych żeruje jeden raz; czas żerowania, zależnie od gatunku, wynosi od kilku do kilkunastu dni [16].

Ze względu na liczbę żywicieli w cyklu życiowym wyróżnia się kleszcze jednożywicielowe, dwużywicielowe oraz trójżywicielowe. W cyklu kleszczy jednożywicielowych samica składa jaja poza ciałem żywiciela (na powierzchni gleby, w ściółce, pod kamieniami). Larwy po wykluciu aktywnie przedostają się na żywiciela i po żerowaniu pozostają na nim. Po przekształceniu do stadium nimfy ponownie żerują, po czym linieją do stadium dorosłego. Dorosłe osobniki po pobraniu pokarmu kopulują. Nasycone pokarmem i zapłodnione samice odpadają od żywiciela i na powierzchni gleby bądź ściółki składają jaja [16, 22]. W cyklu kleszczy dwużywicielowych podobnie jak w cyklu kleszczy jednożywicielowych samice składają jaja na podłożu, gdzie z jaj wylęgają się larwy. Larwy i nimfy żerują na tym samym osobniku żywicielskim. Następnie nimfy odpadają od żywiciela by na podłożu przekształcić się w osobniki dorosłe, które aktywnie przedostają się na drugiego żywiciela, na którym żerują i kopulują. Zapłodnione samice odczepiają się od żywiciela i opadają na podłoże, gdzie składają jaja [16, 22]. W cyklu kleszczy trójżywicielowych każde aktywne stadium rozwojowe żeruje na innym żywicielu. Przekształcenie do kolejnych stadiów rozwojowych oraz składanie jaj odbywa się poza żywicielem [16, 22]. Najczęściej przedstawiciele każdego kolejnego stadium rozwojowego żerują na żywicielu większym od poprzedniego [14]. Z reguły larwy i nimfy atakują płazy, gady, ptaki i mniejsze ssaki, natomiast osobniki dorosłe atakują ptaki bądź ssaki większe w stosunku do poprzednich żywicieli [24]. Przykładem może być kleszcz łąkowy *Dermacentor reticulatus*, którego larwy atakują m.in. nornicę rudą czy ryjówkę aksamitną. Żywicielem nimf mogą być zając szarak bądź królik, natomiast dorosłe osobniki atakują m.in. psy, łosie, konie oraz domowe przeżuwacze. W cyklu trójżywicielowym istnieją odstępstwa od tej reguły; przykładem może być kleszcz *Ixodes ricinus*, którego zarówno larwy, nimfy jak i osobniki dorosłe pasożytują u człowieka [16, 22]. Cykl kleszczy trójżywicielowych jest najczęściej spotykanym cyklem rozwojowym. Spośród znanych około 640 gatunków kleszczy właściwych ponad 95% należy do kleszczy trójżywicielowych, w tym wszystkie gatunki występujące w Polsce [16].

Cykl rozwojowy kleszczy trójżywicielowych jest jednym z istotnych czynników wpływających na zdolność do transmisji chorób. Jak wcześniej wspomniano, w tego typu cyklu kolejni żywiciele należą do innego gatunku, dzięki temu utrzymywana jest ciągłość krążenia patogenów w populacji dzikich zwierząt [19, 24]. Równocześnie możliwe jest przenoszenie chorób na człowieka i zwierzęta towarzyszące np. psy, które mają sporadyczny kontakt bądź nie mają w ogóle kontaktu bezpośredniego z dzikimi zwierzętami, będącymi naturalnymi żywicielami kleszczy oraz rezerwuarami chorób przez nie przenoszonych [1, 14]. Przykładem takiej choroby jest borelioza, której rezerwuarem zależnie od genogatunku *Borrelia burgdorferi* są ptaki (*B. garinii*) oraz gryzonie (*B. afzelii*). Inną chorobą zarówno zwierząt jak i człowieka jest anaplazmoza granulocytarna, której rezerwuarem mogą być dzikie przeżuwacze oraz gryzonie. W przypadku tych chorób tak człowiek, jak i zwierzęta mu towarzyszące są przypadkowymi żywicielami podczas krążenia zarazków w populacji dzikich zwierząt [1, 2, 9]. Wpływa na to kolejny czynnik mający istotne znaczenie w przenoszeniu chorób przez kleszcze. Czynnikiem tym jest niska swoistość kleszczy trójżywicielowych względem żywiciela [23]. Żywicielem dorosłych samic kleszcza pospolitego *I. ricinus* może być zarówno bydło, jak i człowiek, a także dzikie przeżuwacze, psy, lisy oraz wszystkie inne lądowe kręgowce stałocieplne [17, 22].

3. Żerowanie kleszczy właściwych

Kleszcze właściwe aktywnie poszukują swoich żywicieli. Gatunki kleszczy trójżywicielowych przed żerowaniem czekają na żywiciela na roślinach, najczęściej na wysokości odpowiedniej dla swojego żywiciela [16, 23]. W jego rozpoznaniu główną rolę odgrywają receptory organu Hallera, głaszczek, szczęk oraz tarczki grzbietowej [22, 23]. Rozpoznawanymi przez kleszcze bodźcami, które informują je o obecności żywiciela, są dwutlenek węgla, drgania podłoża oraz wyższa temperatura ciała żywiciela względem otoczenia [3]. Przykładem może być reakcja larw kleszcza *Boophilus microplus* na częstotliwość drgań w przedziale 80–800 Hz, która odpowiada zakresowi dźwięków wytwarzanych przez wypasające się bydło [22]. Kleszcze po rozpoznaniu żywiciela aktywnie przedostają się na jego ciało, po czym rozpoczynają wędrówkę, trwającą do kilku godzin, w poszukiwaniu miejsc przyczepu. Jako miejsce przyczepu wybierają miejsca silnie ukrwione, z delikatną skórą, osłonięte przed słońcem o stałej temperaturze i wilgotności [16]. Takimi miejscami u zwierząt są: małżowiny uszne, szyja, pachy, pachwiny, okolica odbytu oraz brzuszna strona tułowia [6, 13].

Okres pobierania pokarmu, trwający kilka do kilkunastu dni, sprzyja przeniesieniu zarazków zarówno z kleszcza na żywiciela, jak i zakażenie żerującego kleszcza [12, 19]. Dłuższy, w porównaniu z innymi krwiopijnymi pasożytami zewnętrznymi, okres pobierania pokarmu przez kleszcze właściwe ma prawdopodobnie istotny wpływ na transmisję chorób zakaźnych i pasożytniczych. Przypuszczenie to potwierdzać może fakt, iż obrzeżki (kleszcze z rodziny *Argasidae*)

pobierając pokarm przez kilka do kilkudziesięciu minut odgrywają niewielką rolę jako wektor chorób transmisyjnych [11]. Przykładami chorób przenoszonych przez kleszcze właściwe wymagających dłuższego czasu żerowania mogą być borelioza i babeszjoza. W przypadku boreliozy zakażenie ludzi i zwierząt krętkami *Borrelia burgdorferi* następuje dopiero po upływie 24 do 50 godzin od rozpoczęcia przez kleszcza pobierania pokarmu [8]. Natomiast eksperymentalne zarażenie chomików sporozoitami pierwotniaków z rodzaju *Babesia* jest tym efektywniejsze im dłużej kleszcze pobierają od nich krew. Stwierdzono, iż stu-procentowa ekstensywność inwazji w grupie chomików następowała dopiero w przypadku, gdy kleszcze po wysyceniu pokarmem same odpadały od swoich żywicieli [10].

Zarówno larwa, nimfa, jak i dorosła samica żerują tylko jeden raz. Samce niektórych gatunków nie odżywiają się krwią. Całkowite nasycenie pokarmem jest niezbędne larwom i nimfom na przejście do kolejnego stadium rozwojowego, natomiast samicom na złożenie jaj. Czas żerowania zależy od stadium rozwojowego oraz gatunku kleszcza. Larwy gatunków z rodzaju *Ixodes* i *Rhipicephalus* żerują około 3–4 dni, natomiast larwy gatunków z rodzaju *Dermacentor* 5–8 dni. Nimfy tych samych gatunków żerują odpowiednio 3–4 oraz 5–6 dni, natomiast dorosłe samice większości gatunków kleszczy właściwych 6–12 dni [16]. Kilkudniowy okres żerowania larw, nimf i dorosłych samic w połączeniu ze zmianą żywiciela przez każde kolejne stadium rozwojowe sprzyja przenoszeniu chorób przez kleszcze właściwe z jednych gatunków zwierząt na inne oraz ze zwierząt na człowieka. Istotne jest w tym przypadku występujące u kleszczy właściwych zjawisko określane jako transstadialne przenoszenie zakażenia polegające na zdolności przetrwania zarazków w organizmie wektora przez okres metamorfozy i linienia pomiędzy jego poszczególnymi stadiami rozwojowymi [18].

4. Mechanizm pobierania pokarmu

W miejscu przyczepu kleszcz wbija szczęki w skórę żywiciela. Wprowadzaniu szczęk i hypostomu (wyposażone w zęby, zrośnięte wyrostki brzusznej podstawy aparatu gębowego) towarzyszy wydzielanie znacznej ilości szybko twardniejącej śliny, która tworzy pochewkę zwaną futeralikiem cementowym. Twór ten wzmacnia przyczep kleszcza do skóry żywiciela ułatwiając w ten sposób długi okres pobierania pokarmu. Całkowite uformowanie futeralika trwa około 48–72 godzin [4, 16].

Pobieranie pokarmu przez kleszcze właściwe odbywa się dzięki ssąco-tłoczącemu działaniu gardzieli, co powoduje naprzemienne wstrzykiwanie śliny do rany w skórze żywiciela oraz zasysanie płynnego pokarmu. Wstrzykiwanie śliny trwa do 1 s, natomiast zasysanie pokarmu 1–30 s. Pomiędzy tymi okresami pojawiają się przerwy trwające kilka sekund do kilku minut [16]. Ponadto, u niektórych gatunków kleszczy występować może zjawisko określane jako regurgitacja, polegające na zwracaniu płynnej treści pokarmowej do rany w skórze żywiciela. Zjawisko takie zaobserwowano u kleszcza psiego *Rhipicephalus sanguineus* [3]. Naprzemienne wstrzykiwanie śliny i zasysanie krwi oraz regurgitacja sprzyjają wprowadzaniu zarazków do organizmu żywiciela. Wraz ze śliną kleszczy wprowadzane do organizmu żywiciela są między innymi takie patogeny jak *Anaplasma phagocytophilum* czy pierwotniaki z rodzaju *Babesia* [7, 10].

Po nasyceniu pokarmem masa ciała samicy może zwiększyć się do 200 razy [22], jednak całkowita masa pobranego pokarmu przekracza kilkakrotnie masę najedzonego kleszcza [16]. Możliwe to jest dzięki procesowi zagęszczania pokarmu, co zachodzi podczas żerowania. Nadmiar wody pobrany wraz z krwią wydalany jest ze śliną kleszcza. Równocześnie pobrany pokarm zużywany jest na procesy energetyczne oraz powiększenie narządów wewnętrznych i okrywy ciała [4, 16, 22]. Przykładowo samica kleszcza *Dermacentor reticulatus* ważąca przed żerowaniem średnio 8,2 mg pobiera podczas żerowania 3657 µl krwi, a jej masa końcowa wynosi 510,5 mg, natomiast samica *Ixodes persulcatus* ważąca średnio przed żerowaniem 2,2 mg pobiera 733 µl krwi, a jej masa końcowa wynosi 262,4 mg [16]. Znaczna objętość jednorazowo pobieranego pokarmu jest jednym z czynników wpływających na zarażenie kleszczy żerujących na żywicielach będących nosicielami chorób odkleszczowych. Równocześnie nadmiar pobranej wody i jonów zwiększa wydzielanie śliny, co również jest jednym z czynników sprzyjających wprowadzaniu zarazków do organizmu żywiciela kleszczy właściwych [3].

5. Immunomodulujące działanie białek obecnych w ślinie kleszczy

Równocześnie z formowaniem futeralika cementowego wydzielany jest drugi rodzaj śliny zawierającej cząsteczki o właściwościach antykoagulacyjnych. Zależnie od gatunku kleszczy opisano różne substancje zawarte w ich ślinie zapobiegające krzepnięciu krwi. Najczęściej są to białkowe inhibitory trombiny (ixina), tromboplastyny (ixodina) oraz czynnika X [4, 12]. Konsekwencją działania tych substancji jest zahamowanie powstawania trombiny niezbędnej do przekształcenia obecnego w osoczu krwi fibrynogenu do fibryny, co skutkuje zahamowaniem krzepnięcia krwi

w miejscu przyczepu kleszcza [21]. Poza białkami o właściwościach antykoagulacyjnych, ślina kleszczy zawiera również substancje o działaniu przeciwzapalnym w mikrośrodowisku, jakim jest miejsce przyczepu kleszcza. Dzięki temu działaniu żerowanie kleszcza nie powoduje bólu. Stwierdzono, iż zawarta w ślinie kleszcza *Ixodes scapularis* karboksypeptydaza blokuje bradykininę ograniczając w ten sposób rozwój procesu zapalnego. Innym przykładem jest obecność w wydzielinie gruczołów ślinowych kleszcza *Rhipicephalus appendiculatus* białka wiążącego histaminę, co również ogranicza rozwój zapalenia [4]. Ślina kleszczy zawiera także prostaglandynę E_2 (PGE_2), która rozszerza naczynia krwionośne w miejscu przyczepu kleszcza, hamuje agregację płytek krwi, degranulację komórek tucznych oraz aktywację limfocytów T [4, 12]. Dzięki tym mechanizmom kleszcz często pozostaje niezauważony przez żywiciela, co umożliwia mu pobieranie pokarmu przez długi czas. Ponadto immunomodulujące działanie białek zawartych w ślinie kleszczy właściwych zwiększa szansę na przetrwanie zarazków wprowadzonych wraz z jego śliną do rany żywiciela w miejscu przyczepu kleszcza. Modyfikacja ta sprzyja rozwojowi choroby, gdyż znaczna część patogenów przenoszonych przez kleszcze to zarazki wewnątrzkomórkowe [4]. Przykładem może być działanie białek, obecnych w ślinie kleszcza psiego *Rhipicephalus sanguineus*, upośledzające proliferację limfocytów T oraz aktywność makrofagów. Stwierdzono, iż ślina kleszczy indukuje lokalną odpowiedź immunologiczną typu Th2 hamując za pośrednictwem IL-10 odpowiedź komórkową oraz reakcję zapalną w miejscu przyczepu kleszcza [3]. Dokładny mechanizm zmiany profilu odpowiedzi immunologicznej z Th1 na Th2 nie jest znany. Najprawdopodobniej nie uczestniczy w nim IL-4 indukująca różnicowanie limfocytów Th0 w kierunku Th2. W doświadczeniu przeprowadzonym na myszach stwierdzono, iż wielokrotna ekspozycja na inwazję kleszczy myszy ze znokautowanym genem dla IL-4 prowadzi do rozwoju odpowiedzi immunologicznej typu Th2 [4].

6. Inne czynniki wpływające na przenoszenie chorób przez kleszcze właściwe

Spośród pozostałych czynników wpływających na przenoszenie chorób przez kleszcze należy wymienić następujące: długi czas życia kleszczy (zależnie od gatunku od kilku miesięcy do ponad 20 lat) oraz transowarialne przekazywanie patogenów. Zjawisko transowarialnego przekazywania drobnoustrojów polega na przenikaniu patogenów do wnętrza rozwijającego się oocytu bez uszkodzenia zarodka, co prowadzi do zarażenia określonymi patogenami potomnego pokolenia kleszczy. Stwierdzono, iż kleszcz *Rhipicephalus bursa* zarażony pierwotniakiem *Babesia ovis* przekazywać go może 44 pokoleniom potomnym [14, 15, 19]. Długi czas życia kleszczy oraz transowarialne przekazywanie drobnoustrojów sprzyjają przetrwaniu naturalnych ognisk chorób transmisyjnych.

7. Podsumowanie

Kleszcze właściwe odgrywają szczególną rolę w przenoszeniu chorób transmisyjnych. Rola ta w znacznym stopniu wynika z biologii tych roztoczy. Szczególne znaczenie mają tutaj takie czynniki jak: niska swoistość względem żywiciela kleszczy trójżywicielowych, długi okres i mechanizm pobierania pokarmu oraz immunomodulujące działanie białek śliny kleszczy właściwych. Ponadto na zakończenie należy dodać, iż wpływ na rozprzestrzenianie chorób transmisyjnych wpływają również czynniki niezwiązane bezpośrednio z biologią kleszczy, lecz z zachowaniami żywicieli kleszczy. Do czynników tych zaliczyć można wędrówki ptaków przenoszących pasożytujące u nich kleszcze na znaczne odległości oraz rozwój turystyki, a w szczególności ludzi wraz z towarzyszącymi im zwierzętami [18].

Piśmiennictwo

1. Bown K., Bennet M.: The role of wildlife and wildlife reservoirs in the maintenance of arthropod-borne infections. (w:) Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat, red. S.E. Shaw, M.J. Day, Manson Publ. Barcelona 2005, s. 23–29
2. Bukowska B., Walory J.: *Anaplasma phagocytophilum* – epidemiologia, diagnostyka i terapia. *Post. Mikrobiol.* **44**, 211–226 (2005)
3. Dantas-Torres F.: The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* **152**, 173–185 (2008)
4. Day M.J. 2005. Interaction of the host immune system with arthropods and arthropod-borne infectious agents. (w:) Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat, red. S.E. Shaw, M.J. Day, Manson Publ. Barcelona 2005, s. 30–40
5. Deryło A.: Classis: *Insecta* Linnaeus, 1758 – Gromada: Owady. (w) Parazytologia i akaroentomologia medyczna, red. A. Deryło, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2002, s. 378–422
6. Foldvari G., Farkas R.: Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. *Vet. Parasitol.* **129**, 125–131 (2005)
7. Foley J., Nieto N.: *Anaplasma phagocytophilum* subverts tick salivary gland proteins. *Trends Parasitol.* **23**, 3–5 (2007)
8. Franz J.K., Krause A.: Lyme diseases (Lyme borreliosis). *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **17**, 241–264 (2003)
9. Harrus S., Waner T., Bjoersdorff A., Shaw S.: Ehrlichiosis and anaplasmosis. (w) Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat, red. S.E. Shaw, M.J. Day, Manson Publ. Barcelona 2005, s. 120–133

10. Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford III S.R., Krause P.J., Persing D.H.: Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 451–469 (2000)
11. Kaufman W.R.: Gluttony and sex in female ixodid ticks: How do they compare to other blood-sucking arthropods? *J. Insect Physiol.* **53**, 264–273 (2007)
12. Mans B.J., Neitz A.W.H.: Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 1–17 (2004)
13. Papadopoulos B., Morel P.C., Aeschlimann A.: Ticks of domestic animals in the Macedonia region of Greece. *Vet. Parasitol.* **63**, 25–40 (1996)
14. Prokopowicz D.: Niektóre cechy kleszczy i ich znaczenie medyczno-weterynaryjne. *Med. Wet.* **52**, 224–226 (1996)
15. Shaw S.E., Day M.J., Birtles R.J., Breitschwerdt E.B.: Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.* **17**, 74–80 (2001)
16. Siuda K.: Kleszcze (*Acari*: *Ixodida*) Polski. Część I, Zagadnienia ogólne. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, Wrocław, 1991
17. Siuda K.: Kleszcze Polski (*Acari*: *Ixodida*). Część II, Systematyka i rozmieszczenie. Polskie Towarzystwo Parazytologiczne, Warszawa, 1993
18. Siuda K.: Stawonogi a choroby transmisyjne. (w) Parazytologia i akaroentomologia medyczna, red. A. Deryło, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2002, s. 423–444
19. Siuda K.: Kleszcze (*Ixodida*) o znaczeniu epidemiologicznym w Polsce. (w) Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze, red. B. Skotarczak, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2006, 25–32
20. Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L.: Veterinary Parasitology. Blackwell Publ. Oxford 2007
21. Topper M.J., Welles E.G.: Hemostasis. (w) Clinical Pathology, red. K.S. Latimer, E.A. Mahaffey, K.W. Prasse, Iowa State Press, A Blackwell Publ. Co. Ames 2003, s. 99–135
22. Varma M.R.G.: Ticks and mites (*Acari*). (w) Medical Insects and Arachnids, red. R.P. Lane, R.W. Crosskey, Chapman & Hall, London 1993, s. 597–658
23. Wall R., Pitts K.: Arthropod vectors of infectious disease: biology and control. (w) Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat, red. S.E. Shaw, M.J. Day, Manson Publ. Barcelona 2005, s. 11–22
24. Wegner Z.: Rola kleszczy występujących w Polsce w epidemiologii chorób transmisyjnych. *Wiad. Parazytol.* **41**, 305–319 (1995)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 299–305
http://www.pm.microbiology.pl

BABESIA SPP. W POLSCE: IDENTYFIKACJA I EPIDEMIOLOGICZNE ZNACZENIE

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Edward Siński*, Renata Welc-Falęciak

Zakład Parazytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (22) 55 41 113
* Autor korespondencyjny: esinski@biol.uw.edu.pl

1. Wprowadzenie. 2. Taksonomia i cykl rozwojowy pasożytów z rodzaju *Babesia.* 3. Babesioza u ludzi w Europie i na świecie oraz źródła zakażenia. 3.1. Źródła zakażenia w Polsce. 4. Konfekcje. 4.1. Koinfekcje u kleszczy *I. ricinus.* 5. Czynniki odpowiedzialne za status babesiozy jako rozprzestrzeniającej się choroby (emerging disease). 6. Wykrywanie zakażeń *Babesia* spp. 6. 1. Próba biologiczna. 6. 2. Metody immunologiczne. 6.3. Metody molekularne. 7. Leczenie. 8. Podsumowanie

***Babesia* spp. in Poland: the identity and epidemic reality**

Abstract: During the last decade new tick-transmitted zoonoses have emerged as threats to the public health in Poland. They are mostly due to infections with *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. and *Babesia* spp. The biology and epidemiology of two species of *Babesia* (*B. divergens*, *B. microti*) as well as the current diagnostic method and the treatment of human babesiosis are briefly outlined. *B. divergens*, a parasite of ruminants, has been found to be agent of human babesiosis in Europe. The majority of severe cases of infections due to these parasites have occurred in splenectomized individuals. However, serological screening suggests that humans in Europe may also be infected with *B. microti.* Human babesiosis due to *B. microti* is generally limited to the northeastern states of the USA, but some cases were also reported in domestic or wild animals in the western states, due to other species namely *B. duncani* (WA1), *Babesia* CA1 and *Babesia* MO1. Standard diagnostic techniques for the detection infection, such as examination of Giemsa-stained thin blood smears, the inoculation of susceptible animals with blood from a suspected case and serology testing, have been complemented by molecular techniques, such as PCR. Diagnosis rates of human babesiosis will increase as the physicians and the public become more aware of the disease, as people live and recreate in the areas endemic for ticks and as the number of immunocompromised individuals increases. The problem in Poland is still poorly recognized and future studies are necessary to elucidate the importance of *Babesia* spp. infections in humans.

1. Introduction. 2. Taxonomy and the life cycle of *Babesia* spp. 3. Human babesiosis: distribution in Europe and worldwide and zoonotic reservoirs. 3.1. Zoonotic reservoirs in Poland. 4. Coinfection. 4.1. Coinfection in *I. ricinus* ticks. 5. Unique features of *Babesia* spp. as an emerging infectious disease. 6. Detection of *Babesia* spp. infections. 6.1. Xenodiagnosis. 6.2. Serology and immunology tests. 6.3. Molecular techniques. 7. Treatment. 8. Conclusions

Słowa kluczowe: *Babesia* spp., choroby odkleszczowe, koinfekcje, źródła zakażenia
Keywords: *Babesia* spp., coinfections, reservoirs of infection, tick-borne disease

1. Wprowadzenie

W latach 90-tych ubiegłego wieku wzrosła znacznie w Europie zachorowalność na nie notowane wcześniej choroby przenoszone przez kleszcze (Acari: *Ixodidae*), tzw. emerging tick-borne diseases (rozwijające się choroby odkleszczowe) [23]. Są to typowe zoonozy jak: borelioza (choroba z Lyme), ehrlichioza, anaplazmoza, bartonelloza i babesioza (piroplasmoza), których czynniki etiologiczne należą do rodzajów *Borrelia* (*Spirochaetaceae*), *Ehrlichia* i *Anaplasma* (*Anaplasmataceae*), *Bartonella* (*Bartonellaceae*) i *Babesia* (*Babesiidae*). Wspólnymi cechami dla tych dość odległych systematycznie grup organizmów są m.in. endemiczne występowanie na obszarze Półkuli Północnej oraz przenoszenie drogą krwi przy udziale wektorów – kleszczy z grupy *Ixodes persulcatus* „complex" [15].

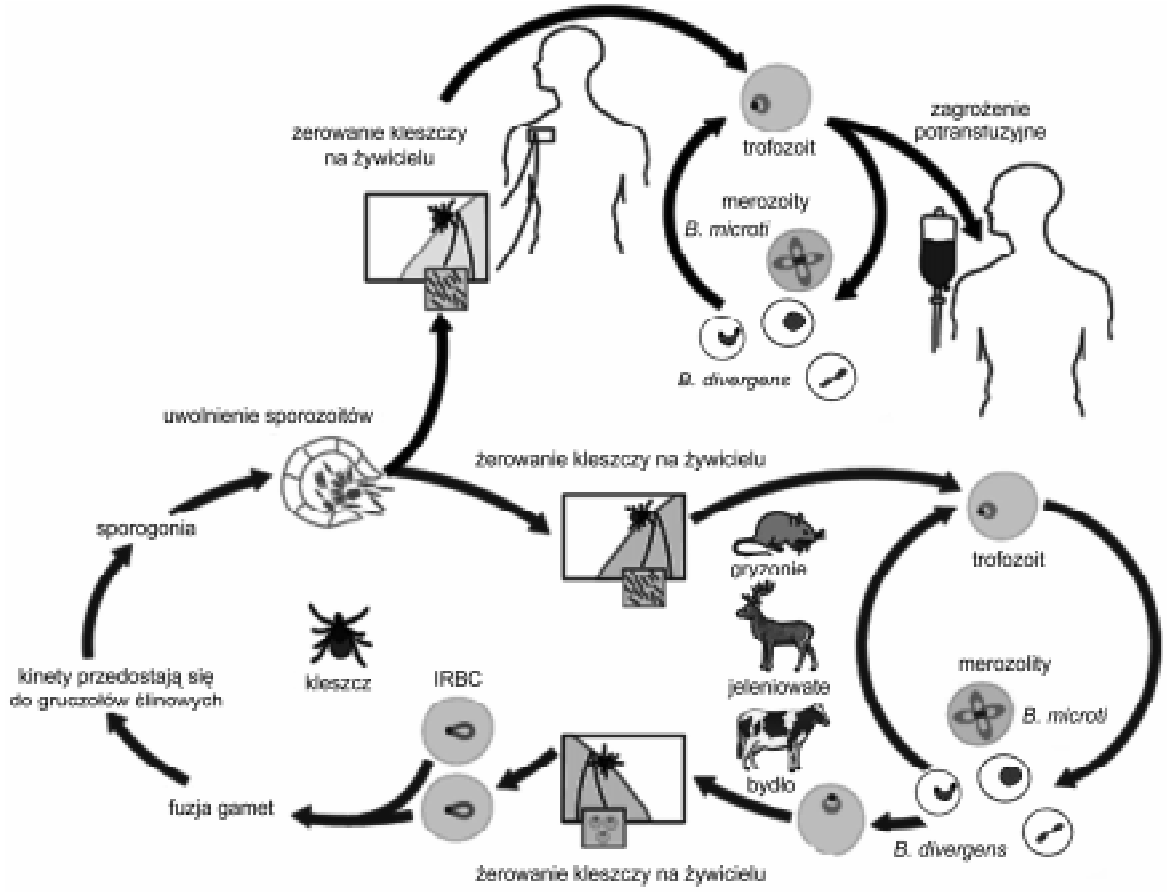
2. Taksonomia i cykl rozwojowy pasożytów z rodzaju *Babesia*

Obecnie *Babesia* zaliczane są do *Chromalveolata* [1], typ *Apicomplexa*, rząd *Piroplasmorida* [49], rodzina *Babesiidae* [28]. Do rodzaju *Babesia* należy ponad 110 gatunków obligatoryjnych wewnątrzkomórkowych pasożytów kręgowców (ssaków i ptaków), w tym również człowieka. Po zakażeniu żywiciela, pasożyty *Babesia* wywołują chorobę – babesiozę [20]. Organizmy te w formie troficznej mają kształt gruszkowaty (stąd druga nazwa, rzadziej używana – piroplazma), wielkość od 1 do 3 μm i pasożytują wyłącznie w erytrocytach swoich żywicieli. Wyjątek stanowi gatunek *Babesia microti* ciągle zaliczany do rodzaju *Babesia*, którego początkowa faza cyklu rozwojowego może przebiegać również w limfocytach i makrofagach,

podobnie jak ma to miejsce u pasożytów z rodzaju *Theileria*. Pasożyty w formie sporozoitów przenoszone są do żywiciela wraz ze śliną żerującego kleszcza. Sporozoity zakażają erytrocyty, w których bezpośrednio w cytozolu, nie tworząc wakuoli (parasitophorus vacuole), rozwijają się do formy zwanej piroplazmą. W procesie pączkowania na dwie (czasami cztery) siostrzane komórki powstają tzw. merozoity, które zakażają kolejne erytrocyty. U pasożytów z rodzaju *Babesia* brak jest schizogonii egzoerytrocytarnej oraz nie pozostawiają one w erytrocytach pigmentu (niestrawiona hemoglobina) i tym różnią się od innych hemopasożytów z rodzaju *Plasmodium* i *Haemoproteus*. Dla kleszczy *Ixodidae* piroplazmy *Babesia* są infekcyjne podczas żerowania na zakażonym żywicielu. Wraz z krwią żywiciela do kleszcza przedostają się gametocyty [49], które w jelicie kleszcza przekształcają się w mikrogamety i makrogamety, a następnie po połączeniu się tworzą ruchliwą zygotę [29]. Zygota wnika do komórek nabłonka jelita kleszcza i tam przekształca się w amebowatą kinetę. Kineta dzieli się i tak zwane „vermicules" zakażają hemocyty, włókna mięśniowe, cewkę Malpighiego, a u samic wnikają do jajników i zakażają oocyty, a tym samym złożone jaja kleszcza i wylęgające się z nich larwy są zakażone tym pasożytem. Tę drogę zakażenia nazywamy transowarialną. Alternatywnie, jeżeli dochodzi do zakażenia hemocytów, włókien mięśniowych, cewek Malpighiego u larw bądź nimf kleszcza, stają się one wówczas infekcyjne dla nowego żywiciela w stadium nimfy lub postaci dojrzałej. Tę drogę zakażenia kleszczy nazywamy transstadialną. Kinety dostające się do gruczołów ślinowych przekształcają się w duże sporonty, w których w wyniku licznych bezpłciowych podziałów (sporogonia) powstają tysiące (ok. 100000) małych sporozoitów. Sporozoity w czasie kolejnego żerowania kleszcza dostają się do krwi nowego żywiciela. Dojrzałe sporozoity wykazują wszystkie cech budowy charakterystyczne dla Apicomplexa, z wyjątkiem barku konoidów. Schemat cyklu rozwojowego pasożytów z rodzaju *Babesia* przestawia Rys. 1.

3. Babesioza u ludzi w Europie i na świecie oraz źródła zakażenia

Pierwszy przypadek zakażenia u ludzi w Europie był opisany w 1957 r. w byłej Jugosławii u rolnika pozbawionego śledziony [43]. U człowieka tego wykazano zakażenie *B. divergens*. Dotychczas opisano w Europie, głównie we Francji, Irlandii, Portugalii,



Rys. 1. Cykl życiowy i obieg *Babesia* spp. (IRBC – infected red blood cells)
(za zgodą National Center for Infectious Diseases, CDC, www.cdc.gov ze zmianami)

Tabela I

Charakterystyka źródła zakażenia dla dwóch gatunków *Babesia* w Polsce

Gatunek pasożyta	Źródło zakażenia	% zakażenia	Kleszcze Ixodidae	% zakażenia
Babesia microti	**Gryzonie** [48]		**Kleszcze zebrane ze zwierząt** [48]	
	Apodemus flavicollis	13	*Ixodes ricinus*	
	Myodes glareolus	12	larwy	3,4
	Microtus arvalis	35	nimfy	5
	Microtus oeconomus	32	*Dermacentor reticulatus*	
			larwy	12
			nimfy	4
			Kleszcze zebrane ze środowiska [37]	
			Ixodes ricinus	
			nimfy	8
			dorosłe	3
Babesia divergens	**Jeleniowate** [36]		**Kleszcze zebrane ze środowiska** [40]	
	Capreolus capreolus	24	*Ixodes ricinus* (dorosłe)	6
	Cervus elaphus			

Hiszpanii, Belgii, Niemczech, Austrii i Szwajcarii oraz byłej Jugosławii 39 przypadków babesiozy u ludzi, większość z nich (25 przypadków) była spowodowana zakażeniem *B. divergens* u ludzi asplenicznych. Po 2000 roku opisano, również u osób pozbawionych śledziony, dwa przypadki zakażenia w Austrii i we Włoszech przez pasożyty określone jako EU1 (*B. venatorum*) stanowiące siostrzaną grupę do *B. divergens* i *B. odocoilei* [17]. W Szwajcarii stwierdzono badaniami serologicznymi 5 przypadków zakażenia przez *B. microti* [12]. Również po raz pierwszy w Niemczech opisano przypadek zakażenia przez *B. microti* u 42 letniej kobiety z obniżoną odpornością [18]. Występowanie *B. venatorum* (EU1) potwierdzono również u kleszczy *I. ricinus* w Słowenii [10], Szwajcarii [6], Francji [3] i Holandii [30]. Najczęstszym źródłem zakażenia dla kleszczy tym gatunkiem pasożyta są dziko żyjące zwierzęta, głównie sarny. Natomiast Hilpertshauser i wsp. w 2006 r. [19] wykryli u kleszczy *I. ricinus* zebranych z jelenia genotyp *Babesia* CH1, bardzo blisko spokrewniony z *B. odocoilei*. Cytowane badania wyraźnie wskazują, że w Europie jest kilka gatunków *Babasia* filogenetycznie bliskich *B. divergens*, które mogą być inwazyjne dla człowieka.

Najwięcej przypadków zakażenia *Babesia* u ludzi stwierdzano w Stanach Zjednoczonych, gdzie od 1968 roku opisano kilkaset zakażeń, głównie powodowanych przez *B. microti.* Ponadto, wykazano również zakażenie w kilku przypadkach genetycznie odmiennymi gatunkami takimi jak *B. duncani* (WA-1) – 7 przypadków [9], *B. divergens* (MO1) – 1 przypadek lub szczep *Babesia* CA1 o nieokreślonej przynależności gatunkowej. Zakażenie u ludzi pasożytami z rodzaju *Babesia* stwierdzano w Afryce, Chinach, Meksyku, Japonii i na Tajwanie. Jeden przypadek przywleczonej babesiozy, niepotwierdzony badaniami serologicznymi i molekularnymi, opisano również w Polsce [21].

3.1. Źródła zakażenia w Polsce

W środowisku naturalnymi żywicielami dla *B. microti* są licznie występujące w różnych siedliskach na terenie całej Polski gryzonie należące do dwóch rodzin: nornikowatych (*Arvicolidae*) i myszowatych (*Muridae*) [32, 38, 39]. Jak wykazały ostatnie badania [48], głównym źródłem zakażenia dla kleszczy *I. ricinus* i *Dermacentor reticulatus* oraz innych żywicieli może być nornik zwyczajny (*Microtus arvalis*), u którego stwierdzono ekstensywność 35% oraz nornik północny o ekstensywności 32%. Kleszcze pasożytujące na tych zwierzętach były również w znacznym stopniu zakażone *B. microti* – od 3,4 do 12%. Szczegółowe wyniki tych badań przedstawia tabela I. Rola kleszczy *Ixodidae* w szerzeniu się babesiozy u ludzi w Polsce jest praktycznie nieznana. Wiadomo, że kleszcze *I. ricinus* są dobrymi wektorami *B. microti* i *B. divergens*, oba gatunki pasożytów badano u kleszczy w fazie wolno żyjącej tylko w wybranych rejonach Polski [33, 37, 40]. Zakażenie samych kleszczy *I. ricinus* przez *B. microti* może odbywać się w stadium larwy lub nimfy (zakażenie transstadialne), co bardzo ogranicza krążenie pasożyta w środowisku naturalnym. Natomiast, zakażenie kleszczy przez *B. divergens* przebiega na drodze transowarialnej i transstadialnej (jajo – larwa – nimfa – postać dojrzała), co w znacznym stopniu może sprzyjać rozprzestrzenianiu się tego gatunku w środowisku naturalnym.

4. Koinfekcje

Pierwsze przypadki koinfekcji *Babesia* z innymi patogenami, głównie z *Borrelia burgdorferi* w Europie były opisane w 1998 roku [14]. Natomiast w Stanach Zjednoczonych poza koinfekcją *Babesia* i *B. burgdorferi*

[24] stwierdzano również zakażenie *Babesia* u osób HIV pozytywnych, co bardzo niekorzystnie wpływało na przebieg babesiozy [11, 31].

W celu oszacowania ryzyka występowania u ludzi koinfekcji *Babesia* spp. z innymi patogenami, przeprowadzono po raz pierwszy w Polsce badania na grupie 46 pacjentów, którzy w wywiadzie epidemiologicznym podali kontakt z kleszczem oraz wszyscy mieli zdiagnozowaną przewlekłą boreliozę. U 64% chorych (n = 14/22) wcześniej stwierdzono badaniami serologicznymi obecność przeciwciał IgG przeciw antygenom *B. microti*, natomiast u 43% potwierdzono obecność przeciwciał skierowanych przeciw *Bartonella* spp. Przeprowadzone przez nas badanie PCR nie potwierdziło obecności DNA *Babesia* i *Bartonella* we krwi badanych chorych. U jednej osoby wykryto koinfekcję *B. burgdorferi* i *Anaplasma phagocytophilum*. Zakażenie *A. phagocytophilum* zostało potwierdzone metodą Real Time PCR.

4.1. Koinfekcje u kleszczy *I. ricinus*

Koinfekcje u kleszczy *I. ricinus* opisywano wielokrotnie na świecie oraz w Europie. Najczęściej u kleszczy zarażeniom *Babesia* towarzyszyły równocześnie infekcje *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum*, rzadziej *Bartonella* spp. [16, 47]. W Polsce odsetek kleszczy zarażonych *Babesia* spp. i *B. burgdorferi* s.l. waha się w granicach od 0.3 do 3.1% [41, 45], rzadziej opisywane są konfekcje *Babesia* spp. i *A. phagocytophilum* (0.7–2.0%). Przypadki koinfekcji trzema pasożytami (*Babesia*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*) odnotowywane są sporadycznie [42].

5. Czynniki odpowiedzialne za status babesiozy jako rozprzestrzeniającej się choroby (emerging disease)

Rozprzestrzeniająca się choroba (emerging disease) według definicji jest nową lub na nowo pojawiającą się infekcją, na ogół oporną na leczenie, na którą zachorowalność ludzi w ciągu ostatnich dwóch dekad wzrasta, lub której zagrożenie wzrośnie w niedalekiej przyszłości [26]. Według tej definicji babesioza jest szerzącą się chorobą u ludzi. Jej pojawianie się jest warunkowane występowaniem w naturalnym środowisku zakażonych zwierząt oraz kleszczy *Ixodidae*, które są przenosicielami pasożytów ze zwierząt do człowieka. Zmieniające się warunki środowiskowe, w tym zmniejszająca się bioróżnorodność w ekosystemach oraz globalne ocieplenie klimatu, mogą mieć istotny wpływ na szerzenie się zakażenia tym pasożytem wśród dziko żyjących i hodowlanych zwierząt oraz w populacjach kleszczy *I. persulcatus* „complex".

W naturalnym ognisku babesiozy ma miejsce wertykalna i horyzontalna transmisja pasożytów. Transmisja wertykalna zachodzi w obrębie populacji kleszczy, dla *B. microti* wiąże się z transstadialnym transferem pasożytów, a w przypadku *B. divergens* – z transferem transstadialnym i transowarialnym (z samicy na potomstwo). Transmisja horyzontalna odbywa się pomiędzy kleszczami a zwierzętami, będącymi źródłem pasożytów. Kleszcze, które ulegają zakażeniu podczas żerowania (ssanie krwi) na zainfekowanym żywicielu, po transferze transstadialnym przekazują pasożyty następnemu żywicielowi podczas kolejnego żerowania. Człowiek nie jest właściwym żywicielem dla kleszczy *I. persulcatus* „complex", w tym *I. ricinus*, jedynie przypadkowo bywa włączony w cykl rozwojowy, początkowo kleszcza, a następnie pasożyta. Wzrastająca liczba ludzi dotkniętych immunosupresją (splenektomia, leczenie kortykosteroidami, AIDS, wiek >50 lat) oraz koinfekcje innymi patogenami przenoszonymi przez kleszcze są czynnikami wpływającymi na szerzenie się babesiozy u ludzi. Coraz częściej stwierdzane są w Stanach Zjednoczonych zakażenia *Babesia* przenoszone nie przez kleszcze, a w czasie transfuzji zakażonej krwi, nie badanej pod kątem obecności tych pierwotniaków [27, 44]. Wśród dawców krwi z obszarów endemicznych dla kleszczy w USA stwierdzono 3.7% seropozytywnych prób w stosunku do antygenów *B. microti* [34]. W Europie, choć nie można wykluczyć pewnego ryzyka, nie notowano dotychczas przypadków zakażenia przez *Babesia* spp. drogą transfuzji krwi.

6. Wykrywanie zakażeń *Babesia* spp.

Nadal do wykrywania zakażenia *Babesia* spp. u ludzi stosuje się badania mikroskopowe rozmazów krwi barwionych najczęściej metodą Giemsa lub Wrighta. W erytrocytach zakażonych osobników można wyróżnić kilka postaci morfologicznych pasożyta: gruszkowatą, pierścieniowatą, ameboidalną, owalną, krzyż Maltański (forma charakterystyczna dla *B. microti*). Na podstawie analizy mikroskopowej nie można jednoznacznie zróżnicować w erytrocytach trofozoitów *B. divergens* i *B. microti*, gdyż oba gatunki w erytrocytach ludzkich wykazują duży pleomorfizm i trofozoity *Babesia* mogą być podobne do postaci wewnątrzkrwinkowych *Plasmodium* spp. Analiza preparatu zależy w dużej mierze od doświadczenia badającego. Przyjmuje się, że doświadczony badacz może wykryć w krwince pojedyncze pasożyty na 10^5–10^6 badanych erytrocytów [4].

6.1. Próba biologiczna

Próba biologiczna polega na inokulacji zwierząt laboratoryjnych krwią osoby, u której metodą mikroskopową wykryto zakażenie. Próbę biologiczną stosuje

Tabela II
Zakres parazytemii u ludzi zakażonych różnymi gatunkami *Babesia*

Gatunek pasożyta	Ludzie o prawidłowym układzie immunologicznym	Ludzie po spelnektomii	Piśmiennictwo
Babesia microti	1–20%	>80%	[35]
Babesia divergens	1–50%	–	[14]

się zawsze w celu potwierdzenia zakażenia u osób z niespecyficznymi objawami chorobowymi, immunologicznie kompetentnych, nie pozbawionych śledziony, u których parazytemia waha się od 1 do 20%. U asplenicznych chorych parazytemia może osiągać aż 80% zakażonych krwinek (tab. II). W próbie biologicznej do wykrycia zakażenia *B. microti* wykorzystuje się chomiki, natomiast gerbile do wykrycia zakażenia *B. divergens*. Zwierzęta użyte w próbie biologicznej są monitorowane stosując technikę mikroskopową (analiza rozmazu krwi barwionego odczynnikiem Giemsy) przez 6 tygodni po inokulacji. Metoda ta jest stosunkowo czuła i pozwala na wykrycie już 300 pasożytów *B. microti* w 1 ml badanej krwi [23].

6.2. Metody immunologiczne

Wyniki badań mikroskopowych powinny być potwierdzone metodami serologicznymi prowadzącymi do określenia miana swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom *Babesia*. Do najczęściej stosowanych testów należą: test immunofluorescencji pośredniej (IFA) i test immunoenzymatyczny (ELISA) [7, 25]. Do wykazania ostrego zakażenia *B. microti* w IFA stosuje się znakowane FITC przeciwciała anty ludzkie IgM. Testem IFA stosowanym do wykrycia zakażenia *B. divergens* wykrywa się przeciwciała w okresie 7–10 dni po hemoglobinurii. Test ten jest mało swoisty, gdyż antygeny *B. divergens* reagują krzyżowo z *Plasmodium* spp. i innymi gatunkami *Babesia*. Wykazanie w IFA swoistych przeciwciał Ig (wszystkich immunoglobulin) lub przeciwciał IgG o mianach >1:256 świadczy o zarażeniu *Babesia* spp. Test ELISA z użyciem rekombinowanych antygenów *B. divergens* jest stosowany na szeroką skalę do wykrywania zakażenia u bydła. Metody serologiczne mają mniejsze znaczenie w diagnozowaniu babesiozy u ludzi po splenektomii lub chorych na AIDS, nie mają natomiast żadnego zastosowania do wykrywania zakażenia u kleszczy.

6.3. Metody molekularne

Największą trudność w diagnozowaniu zakażeń *Babesia* u ludzi i zwierząt oraz monitorowaniu zarażenia kleszczy stanowi zbyt mała liczba pierwotniaków w materiale badawczym. Dlatego w diagnostyce babesiozy oraz badaniach epidemiologicznych stosuje się obecnie niezwykle czułe metody molekularne (PCR, nested PCR, Real Time PCR). Gen małej podjednostki rybosomu (18S rRNA) jest najczęściej wykorzystywanym markerem genetycznym w badaniach molekularnych *Babesia.* Wielkość genu 18S rRNA wynosi około 1700 pz, zawiera on zarówno sekwencje konserwatywne ewolucyjnie, jak i charakteryzujące się wysoką zmiennością, co umożliwia analizę pokrewieństwa badanych izolatów [2, 8]. Gen β-tubuliny koduje podjednostkę β białka tubuliny, które wchodzi w skład komórkowych protofilamentów i mikrotubul. Analiza produktów PCR wykazała znaczne różnice w ich wielkości w zależności od gatunku *Babesia*, co umożliwia bezpośrednią identyfikację pasożyta, bez konieczności przeprowadzania dalszych badań, tj. poprzez analizę RFLP czy sekwencjonowanie uzyskanego produktu. Jednak przy amplifikacji genu β-tubuliny *Babesia* zaobserwowano równoczesne namnażanie DNA zarażonego żywiciela, tym wydajniejsze, im niższa była obserwowana parazytemia [5]. Gen białka szoku cieplnego *hsp70* jest jednym z najsilniej konserwatywnych białek szoku cieplnego, które występują powszechnie u wszystkich organizmów żywych i ulegają aktywacji oraz biosyntezie w czasie stresu komórkowego. Gen *hsp70* wykazuje duży konserwatyzm nawet pomiędzy niespokrewnionymi gatunkami, dlatego nie znajduje zastosowania w badaniach filogenetycznych i epidemiologicznych [22, 50].

Tabela III
Leczenie babesiozy objawowej po zakażeniu *Babesia microti*

Antybiotyk	Stosowanie leku		
	Dawka doustna dla dorosłych	Częstość podawania	Czas leczenia
Klindamycyna (clindamycin) + chinina (quinine)	600 mg 650 mg	co 8 godzin co 8 godzin	7–10 dni 7–10 dni
Atowakon (atovaquone) + azytromycyna (azithromycin)	750 mg 500–600 mg 250 mg	co 12 godzin raz dziennie jednorazowa codziennie po 1 dniu leczenia	7–10 dni 7–10 dni

7. Leczenie

W leczeniu objawowej babesiozy (piroplazmozy) stosuje się jednocześnie chininę i antybiotyki z grupy linkozamidów: klindamycynę lub atowakon i azytromycynę. Dawki i sposób leczenia wg S t o w e l l a i wsp. [46] przedstawia tab. III. Ludzie z grupy podwyższonego ryzyka zakażenia (asplenia, immunosupresja, wiek powyżej 50 lat), przy występujących objawach takich jak: zaburzenia oddechowe, duża hemoliza, ostre zaburzenia pracy nerek, rozsiana wewnątrznaczyniowa koagulacja krwinek, oraz, co jest bardzo ważne, przy parazytemii powyżej 10%, kwalifikują się do aferezy erytrocytów. Koinfekcje z innymi patogenami wywołującymi choroby odkleszczowe takie jak: borelioza, ehrlichioza i anaplazmoza, znacznie utrudniają proces leczenia babesiozy. Najdokładniej zostało to wykazane w przypadku równoczesnego zakażenia z wirusem HIV [11, 31] lub *Borrelia burgdorferii s.l.* [24].

8. Podsumowanie

Badania ostatnich lat wykazały, że w Europie istnieje kilka gatunków (genotypów) *Babesia* filogenetycznie bliskich *B. divergens*, które mogą być infekcyjne dla człowieka. Wykazano również pierwszy udokumentowany przypadek zakażenia człowieka przez *B. microti*. Oba gatunki pasożytów, które mogą być przyczyną pojawiania się nowych zoonoz (emerging tick-borne diseases) są w Polsce niedostatecznie poznane. Wstępne badania epidemiologiczne prowadzone w naszym kraju niewątpliwie wskazują na istotną rolę zoonotycznych źródeł (gryzonie i jeleniowate) oraz wektora – kleszczy *I. ricinus* w utrzymywaniu w środowisku naturalnym, często w bliskim sąsiedztwie człowieka, ognisk zakażenia. Wyniki tych badań, zgodnie ze światowym postępem wiedzy w tym zakresie, powinny być wskazówką dla służby zdrowia (głównie lekarzy), w uwzględnianiu również babesiozy przy diagnozowaniu zoonoz odkleszczowych.

Piśmiennictwo

1. Adl S.M., Taylor M.F.J.R. i wsp.: The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protests. *J. Eukaryot. Microbiol*. **52**, 399–451 (2005) (cytowana praca jest dziełem 28 autorów)
2. Allsopp M.T., Allsopp B.A.: Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1081**, 509–17 (2006)
3. Bonnet S., Jouglin M., L'Hostis M., Chauvin A.: *Babesia* spp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg. Infect. Dis*. **13**, 1208–1210 (2007)
4. Büse R., Jorgensen W.K., Dalgiesh R.J., Friedhoff K.T., de Vos A.J.: Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol*. **57**, 61–74 (1995)
5. Cacciň S., Cammŕ C., Onuma M., Severini C.: The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1181–1185 (2000)
6. Casati S., Sager H., Gern L., Piffaretti J.C.: Presence of potentially pathogenic *Babesia* spp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **13**, 65–70 (2006)
7. Chisholm E.S., Ruebsh II T.K., Sulzer A. J., Healy G.R.: *Babesia microti* infection in man: evaluation of an indirect immunofluorescent antibody test. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **27**, 14–19 (1978)
8. Conrad P.A., Thomford J.W., Marsh A., Telford S.R. 3rd, Anderson J.F., Spielman A., Sabin E.A., Yamane I., Persing D.H.: Ribosomal DNA probe for differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* isolates. *J. Clin. Microbiol*. **30**, 1210–1215 (1992)
9. Conrad P.A., Kjemtrup A.M., Carreno R.A., Thomford J., Wainwright K., Eberhard M., Quick R., Telford S.R. 3rd, Herwaldt B.L.: Description of *Babesia duncani* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms. *Int. J. Parasitol.* **36**, 779–789 (2006)
10. Duh D., Petrovec M., Bidovec A., Avsic-Zupanc T.: Cervids as *Babesiae* hosts, Slovenia. *Emerg. Infect. Dis*. **11**, 1121–1123 (2005)
11. Falagas M.E., Klempner M.S.: Babesiosis in patients with AIDS: a chronic infection presenting as fever of unknown origin. *Clin. Infect. Dis*. **22**, 809–812 (1996)
12. Foppa I.M., Krause P.J., Spielman A., Goethert H., Gern L., Brand B., Telford S.R. : Entomological and serological evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 722–725 (2002)
13. Genchi C.: Human babesiosis, an emerging zoonosis. *Parassitologia*, **49** (Suppl. 1), 29–31 (2007)
14. Gorenflot A., Moubri K., Precigout E., Carcy B., Schetters T.P.M.: Human babesiosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **92**, 489–501 (1998)
15. Gray J.S., Robertstson J.N., Kahl O.: Lyme borreliosis and other emerging tick-borne zoonoses in Europe. Modern perspectives on zoonoses. (Ed) Holland C. V., Royal Irish Academy, Dublin, 1997, s. 84–94
16. Halos L., Jamal T., Maillard R., Beugnet F., Le Menach A., Boulouis H.J., Vayssier-Taussat M.: Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet. Res*. **36**, 79–87 (2005)
17. Herwaldt B.L., Pieniążek N.J. i wsp.: Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organizm causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis*. **9**, 942–948 (2003) (cytowana praca jest dziełem 14 autorów)
18. Hildebrandt A., Hunfeld K.P., Baier M., Krumbholz A., Sachse S., Lorenzen T., Kiehntopf M., Fricke H.J., Straube E.: First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 595–601 (2007)
19. Hilpertshauser H., Deplazes P., Schnyder M., Gern L., Mathis A.: *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6503–6507 (2006)
20. Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford III, S.R., Krause P.J., Persing D.H.: Babesiosis *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 451–469 (2000)
21. Humiczewska M., Kuźna-Grygiel W.: A case of imported human babesiosis in Poland. *Wiad. Parazytol*. **43**, 227–229 (1997)

22. Jie H.B., Bailey C.W., Ray B.K., Estes D.M., Kumar N., Carson C.A.: Single copy *Babesia microti* hsp70. *Mol. Biochem. Parasitol*. **83**, 241–246 (1996)
23. Kjemtrup A.M., Conrad P.A.: Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1323–1337 (2000)
24. Krause P.J., Persing D.H. i wsp.: Concurrent Lyme disease and babesiosis: evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA*, **275**, 1657–1660 (1996) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
25. Krause P.J., Persing D.H. i wsp.: Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N. Engl. J. Med*. **339**, 160–165 (1998) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
26. Lederberg J., Shope R.E, Oaks S.C.: Emerging infections: microbial threats to healh in the United States, Institute of Medicine (US), Committee on Emerging Microbial Theats to Health, Washington, National Academy Press, 1992
27. Leiby D.A., Chung A.P., Gill J.E., Houghton R.L., Persing D.H., Badon S., Cable R.G.: Demonstrable parasitemia among Connecticut blood donors with antibodies to *Babesia microti*. *Transfusion*, **45**, 1804–1810 (2005)
28. Levine N.D.: The protozoan Phylum Apicomplexa. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988, s. 1–154
29. Mehlhorn H., Schein E.: The piroplasms: life cycles and sexual stages. *Adv. Parasitol*. **23**, 37–103 (1984)
30. Nijhof A.M., Bodaan C., Postigo M., Nieuwenhuijs H., Opsteegh M., Franssen L., Jebbink F Jongejan F.: Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis*. **7**, 585–596 (2007)
31. Ong K.R., Stavropoulos C., Inada Y.: Babesiosis, asplenia, and AIDS. *Lancet*, **336**, 112 (1990)
32. Pawełczyk A., Bajer A., Behnke J. M., Gilbert F. S., Sinski E.: Factors affecting the component community structure of haemoparasites in common voles (*Microtus arvalis*) from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitol. Res.* **92**, 270–284 (2004)
33. Pieniazek N., Sawczuk M., Skotarczak B.: Molecular identification of *Babesia* parasites isolated from *Ixodes ricinus* ticks collected in northwestern Poland. *J. Parasitol*. **92**, 32–35 (2006)
34. Popovsky M.A., Lindberg L.E., Syrek L., Page P.L.: Prevalence of *Babesia* antibody in a selected blood donor population. *Transfusion*, **28**, 59–61 (1988)
35. Rosner F., Zarrabi M.H., Benach J.L., Habicht G.S.: Babesiosis in splenectomized adults: review of 22 reported cases. *Am. J. Med*. **76**, 696–701 (1984)
36. Sawczuk M., Maciejewska A., Adamska M., Skotarczak B.: Roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) as a reservoir of protozoans from *Babesia* and *Theileria* genus in north-western Poland. *Wiad. Parazytol.* **51**, 243–247 (2005)
37. Siński E., Bajer A., Welc R., Pawełczyk A., Ogrzewalska M., Behnke J.M.: *Babesia microti*: Prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of north-eastern Poland. *Int. J. Med. Microbiol*. **296** (S1), 137–143 (2006)
38. Siński E., Karbowiak G.: Ticks (Ixodidae) in zoonotic transmission of *Babesia microti* and *B. divergens*. *Wiad. Parazytol*. **41**, 321–327 (1995)
39. Siński E.: Enzootic reservoir for new *Ixodes ricinus*-transmitted infections. *Wiad. Parazytol.* **45**, 135–142 (1999)
40. Skotarczak B., Cichocka A.: Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **8**, 187–189 (2001)
41. Skotarczak B., Wodecka B., Cichocka A.: Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **9**, 25–28 (2002)
42. Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M.: Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *J. Parasitol.* **89**, 194–196 (2003)
43. Skrabalo Z., Deanovic Z.: Piroplasmosis in man; report of a case. *Doc. Med. Geogr. Trop*. **9**, 11–16 (1957)
44. Smith R.P., Evans A.T., Popovsky M., Mills L., Spielman A.: Transfusion-acquired babesiosis and failure of antibiotic treatment. *JAMA*, **256**, 2726–2727(1986)
45. Stańczak J., Gabre R.M., Kruminis-Łozowska W., Racewicz M., Kubica-Biernat B.: *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**, 109–114 (2004)
46. Stowell C.P., Gelfand J.A., Shepard J.A.O. Kratz A.: Case 17–2007: a 25-year-old woman with relapsing fevers and recent onset of dyspnea. *N. Engl. J. Med*. **356**, 2313–2319 (2007)
47. Swanson S.J., Neitzel D., Reed K.D., Belongia E.A.: Coinfections acquired from ixodes ticks. *Clin. Microbiol. Rev*. **19**, 708–727 (2006)
48. Welc-Falęciak R., Bajer A., Behnke J.M., Siński E.: Effects of host diversity and the community composition of hard ticks (Ixodidae) on *Babesia microti* infection. *Int. J. Med. Microbiol*. (2008) doi:10.1016/j.ijmm.2007.12.002
49. Wenyon C.M.: Protozoology. In: A Manual for Medical men, Veterinarians and Zoologists, vol. II. Hafner Publish. Co., New York, 1926, s. 986 (reprinted in 1965)
50. Yamasaki M., Tajima M., Lee K.W., Jeong J.R., Yamato O., Maede Y.: Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70. *Vet. Parasitol.* **110**, 123–129 (2002)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 307–311
http://www.pm.microbiology.pl

NOWE RIKETSJOZY W EUROPIE

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Tomasz Chmielewski*, Stanisława Tylewska-Wierzbanowska

Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. (22) 542 12 61
* Autor korespondencyjny: e-mail: tchmielewski@pzh.gov.pl

1. Wprowadzenie. 2. *R. slovaca*. 3. *R. aeschlimannii*. 4. *R. massiliae*. 5. *R. helvetica*. 6.Szczepy niepatogenne. 7. Ludzka granulocytarna anaplazmoza (ehrlichioza). 8.Podsumowanie

New rickettsioses in Europe

Abstract: Rickettsioses represent some of the oldest as well as most recently recognized infectious diseases. Employment of molecular biology methods, based predominantly on PCR and improved cell culture technics, allowed scientists to discover new pathogens of the genus *Rickettsiales*. In this study, the recent epidemiological situation of most new rickettsioses in Europe is reviewed.

1. Introduction. 2. *R. slovaca*. 3. *R. aeschlimannii*. 4. *R. massiliae*. 5. *R. helvetica*. 6. Nonpathogenic strains. 7. Human granulocytic anaplasmosis (ehrlichiosis). 8. Conclusions

Słowa kluczowe: riketsjozy, anaplazmoza
Key words: rickettsioses, anaplasmosis

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach klasyfikacja riketsji uległa modyfikacji. Jak inne Gram-ujemne bakterie te zaliczane są do grupy alfa-proteobakterii. Na podstawie analizy genetycznej, rząd *Rickettsiales* podzielono na dwie rodziny: *Rickettsiaceae* i *Anaplasmataceae*, jednocześnie usuwając rodziny *Bartonellaceae* oraz *Coxiellaceae*, historycznie należące do grupy drobnoustrojów określanych jako riketsje. Rodzina *Rickettsiaceae* zawiera rodzaj *Rickettsia* i *Orientia*. Rodzaj *Rickettsia* jest podzielony na grupę durów wysypkowych oraz grupę gorączek plamistych. Wszystkie riketsje przenoszone przez kleszcze (z wyjątkiem *R. belli* i *R. canadiensis*) należą do grupy riketsji wywołujących gorączki plamiste (ang. Spotted Fever Group, SFG). Grupa ta przechodzi obecnie największy rozwój.

Różne gatunki bakterii należące do rzędu *Rickettsiales* wywołują ostre choroby gorączkowe. W obrębie tych zakażeń można wyróżnić riketsjozy znane od wielu lat, a także odkryte stosunkowo niedawno. Do riketsjoz zaliczamy grupę durów wysypkowych (dur wysypkowy epidemiczny, sporadyczny i dur szczurzy) oraz grupę gorączek plamistych (gorączka plamista Gór Skalistych, gorączka śródziemnomorska, północnoazjatycka gorączka kleszczowa, ospa riketsjowa, dur kleszczowy z Queensland i dur zaroślowy).

Dur wysypkowy epidemiczny (wywoływany przez *R. prowazekii*) szerzący się podczas wojen i klęsk żywiołowych obecnie występuje sporadycznie. Rezerwuar w czasie epidemii stanowi człowiek, a wektorem jest wesz odzieżowa (*Pediculus humanus corporis*). Do zakażenia dochodzi poprzez przypadkowe wtarcie kału wszy w uszkodzone miejsca skóry. Objawy kliniczne to przede wszystkim silny ból głowy, ból mięśni i wysoka gorączka, wysypka plamista początkowo na tułowiu, a następnie na całym ciele. Przebieg choroby jest bardzo ciężki, z zaburzeniami świadomości i uszkodzeniem układu krążenia. U osób, które przechorowały dur wysypkowy epidemiczny lub miały kontakt z osobami chorymi zdarzają się nawroty pod postacią choroby Brill-Zinssera, która cechuje się znacznie łagodniejszym przebiegiem. Obecnie epidemie duru wysypkowego występują wśród ludności na terenach o niskim poziomie ekonomicznym, któremu towarzyszą zaniedbania higieniczne. Do masowych zachorowań dochodzi często w obozach przesiedleńczych. Do takiej epidemii doszło np. w Burundi, po wojnie domowej, gdzie liczba przypadków duru doszła do ok. 100 tysięcy. Małe ogniska oraz pojedyncze przypadki opisywane są także na terenie Rosji i USA. Podobnie dur szczurzy (wywoływany przez *R. mooseri*), dotyczy przede wszystkim biednych rejonów, często występuje w obozach dla uchodźców, gdzie poziom sanitarny jest bardzo niski. Ogniska tej choroby to także rejony miast, w których bytują duże populacje szczurów (miasta portowe). Przypadki zachorowań stwierdzano w USA (stan Texas), w Afryce, w południowo-wschodniej Azji. Riketsjoza ta przenoszoszona jest na człowieka przez pchły i wszy ludzkie (*Pulex irritans*, *Pediculus humanus*), a do zakażenia dochodzi drogą wziewną lub przez kontakt uszkodzonej skóry z odchodami pcheł [12, 21, 32].

Gorączki plamiste są wywoływane przez różne gatunki riketsji, których występowanie wiąże się z określonymi rejonami geograficznymi. Zakażenie przenoszone jest przez różne gatunki kleszczy obecne w danym

regionie. Najlepiej poznane to: gorączka śródziemnomorska (*R. conori*) opisana w 1909 roku i gorączka plamista Gór Skalistych (*R. rickettsii*) opisana w 1899. Większość z nich charakteryzuje się wystąpieniem w miejscu ukłucia przez kleszcza zmiany martwiczej w postaci czarnego strupa (oprócz gorączki plamistej Gór Skalistych) z powiększeniem okolicznych węzłów chłonnych i wysoką gorączką, a po kilku dniach wysypki plamistej [19, 20, 28].

Stosowane dawniej tradycyjne metody mikrobiologiczne (barwienie metodą Giemsy lub Castaneda) pozwalały jedynie na ogólną charakterystykę riketsji opartą o ich cechy morfologiczne. Metody serotypowania oparte na mikroimmunofluorescencji, wykorzystujące trzy białka powierzchniowe OmpA, OmpB i PS120, choć niedoskonałe, były podstawą do identyfikacji poszczególnych gatunków w latach 80-tych i 90-tych. Duże podobieństwo sekwencji 16S rRNA wśród riketsji, także ograniczało przydatność tego genu w identyfikacji nowych gatunków.

Przełom w identyfikacji nowych gatunków nastąpił po zsekwencjonowaniu w 2001 roku genomu *R. conori* (szczep Seven). Obecnie klasyfikacja izolowanych szczepów riketsji do rodzaju, grupy i gatunku opiera się na sekwencjonowaniu amplifikowanych fragmentów pięciu genów tj. 16S rRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB*, oraz genu białka D. Zgodnie z tymi zasadami, aby szczep zaklasyfikować do danego gatunku, stopień homologii sekwencji ich genów nie może być mniejszy niż 99,8% dla 16S rRNA, 99,9% dla *gltA*, 98,8% dla *ompA*, 99,2% dla *ompB* oraz 99,3% dla genu białka D. Na tej zasadzie riketsje wywołujące gorączki plamiste (SFG) podzielono na 5 grup:

grupa *R. rickettsii*,
grupa *R. massiliae*,
grupa *R. helvetica*,
grupa *R. akari*
oraz grupa pierwotna (ang. Ancestral group).

Przyjęte zasady w przyszłości, ze względu na nową wiedzę, mogą być modyfikowane [4, 8, 9, 22, 23, 24].

Nowe riketsjozy, opisane m.in. dzięki tym metodom w ostatnim dwudziestoleciu, to japońska gorączka plamista (*R. japonica*), gorączka plamista wyspy Flindersa (*R. honei*), kleszczowa gorączka afrykańska (*R. africae*), riketsjoza kalifornińska (*R. felis*), a także nienazwane dotąd riketsjozy wywoływane przez *R. heilonjiangensis*, *R. aeschlimannii*, *R. parkeri*.

Nowymi riketsjozami opisanymi w ostatniej dekadzie w Europie są zakażenia wywoływane przez *R. slovaca*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *R. massilliae*.

2. *R. slovaca*

Po raz pierwszy *R. slovaca* została wyizolowana w 1968 roku z kleszcza *Dermacentor marginatus* na terenach dawnej Czechosłowacji. Obecnie wiadomo, że riketsje te występują w całej Europie. Ich wektorem są kleszcze z gatunków *I. ricinus*, *Haemaphisalis punctata* oraz *H. sulcata*. Przez blisko 20 lat była uznawana za niepatogenny gatunek występujący jedynie w kleszczach. Pierwszy przypadek zachorowania opisano w 1997 roku, lecz pierwsza izolacja od chorego miała miejsce w 2003 roku. Cechą charakterystyczną tych zakażeń jest pojedynczy strup w miejscu ukłucia przez kleszcza na skórze owłosionej głowy, któremu towarzyszy powiększenie węzłów chłonnych okolicy szyi. Gorączka i zaczerwienienie występują u około połowy chorych. Następstwem przechorowania może być miejscowy brak włosów i przewlekłe zmęczenie. Taki obraz był opisywany wcześniej jako TIBOLA (ang. Tick-borne lymphadenopathy). Zespół o podobnych objawach i przebiegu stwierdzany na terenie Hiszpanii nazwano DEBONEL (ang. *Dermacentor*-borne necrosis-erythema-lymphadenopathy). Większość zachorowań występuje między październikiem i kwietniem (szczyt w listopadzie). Zakażenie dotyczy głównie dzieci. Obserwowany okres wylęgania choroby wynosi do 8 dni. Do 2000 roku wykryto kilkadziesiąt takich przypadków we Francji, na Węgrzech, w Bułgarii i w Hiszpanii, część potwierdzono metodami biologii molekularnej [5, 10].

W Polsce dotychczas nie stwierdzono chorych z TIBOLA. Jednak badania kleszczy *I. ricinus* oraz *D. reticulatus* przeprowadzone w NIZP-PZH w Warszawie oraz w innych ośrodkach potwierdziły występowanie *R. slovaca* u tych stawonogów. Dotychczas wykryto je w województwach Podlaskim oraz Mazowieckim.

3. *R. aeschlimannii*

W Europie ten gatunek riketsji wykrywano w kleszczach *Haemaphysalis inermis* i *Hyalomma marginatum marginatum* w Portugalii, Hiszpanii, Chorwacji i w Grecji. Pierwsze zachorowania o tej etiologii to dwa przypadki importowane z Maroka i RPA w 2002 roku, potwierdzone metodą PCR i badaniami serologicznymi. Zakażenie to objawia się jako zmiana skórna w postaci strupa z towarzyszącą plamisto-grudkową wysypką i gorączką.

Prawdopodobne rodzime przypadki zakażeń *R. aeschlimannii* miały miejsce w Hiszpanii. Analizowano mianowicie przypadki gorączki śródziemnomorskiej tam występującej. Jej wektorem jest kleszcz *Rhipicephalus sanguineus* sporadycznie atakujący ludzi. Pozostawia on zwykle jedną zmianę na skórze w przeciwieństwie do kleszczy *Hyalomma marginatum marginatum*, które chętnie atakują człowieka i są często przyczyną wizyt w gabinetach zabiegowych. Dlatego na podstawie obrazu klinicznego oraz faktu wykrywania *R. aeschlimannii* u tych kleszczy, rozpoznano gorączkę plamistą o tej etiologii [11].

4. *R. massiliae*

Po raz pierwszy *R. massiliae* izolowano z krwi 45-letniego mężczyzny w 1985 roku we Włoszech. Szczep sklasyfikowano pierwotnie jako *R. conorii*. U mężczyzny stwierdzono strup z widoczną martwicą, wysypkę plamisto-grudkową okolic dłoni oraz stóp, gorączkę i powiększoną wątrobę. Maksymalne miano przeciwciał w surowicy krwi dla *R. conorii* wyniosło 80. Dopiero 20 lat później, na podstawie sekwencjonowania fragmentów genów *gltA* oraz *ompA*, ostatecznie zidentyfikowano etiologię zakażenia.

Wektorem *R. massiliae* w Europie są kleszcze *Rhipicephalus sanguineus* i *Rhipicephalus turanicus* występujące w basenie Morza Śródziemnego. Bakterie te stwierdzono w ślinie kleszczy, co świadczy o tym, że do zakażenia może dochodzić podczas nakłucia skóry przez kleszcza.

5. *R. helvetica*

R. helvetica została wyizolowana w Szwajcarii w 1979 roku i była uważana za niepatogenny gatunek występujący w kleszczach *Ixodes ricinus* w wielu krajach Europy, m.in.: we Francji, Szwecji, Słowenii, Portugalii, Włoszech, Bułgarii. W 1999 roku *R. helvetica* była przyczyną zapaleniem osierdzia u pacjentów w Szwecji, a etiologię ustalono na podstawie badań metodą PCR, metodą serologiczną oraz w mikroskopie elektronowym [14–16]. Rok później opisano gorączkę niewiadomego pochodzenia u pacjenta we Francji, u którego obserwowano serokonwersję w badaniach serologicznych z antygenem *R. helvetica*. Podobne pojedyncze przypadki stwierdzano na terenie Szwajcarii i Włoch, a etiologię ustalono na podstawie mikroimmunofluorescencji oraz badania metodą Western-blot [2, 3, 7, 18, 29].

Badania kleszczy na terenie Polski wskazują, że *R. helvetica* występuje w północnych oraz w centralnych rejonach kraju. Brak jest jednak doniesień o zachorowaniach wywołanych przez te drobnoustroje w Polsce.

6. Szczepy niepatogenne

Obok gatunków chorobotwórczych, w kleszczach na terenie Europy stwierdzono obecność szeregu niepatogennych szczepów o nieustalonej taksonomii. W końcu lat 90-tych w europejskiej i azjatyckiej części Rosji wykryto szczep RpA4 w kleszczach *Dermacentor reticulatus*, *D. niveus* i *Rhipicephalus pumilio*. Chociaż nie udowodniono jego właściwości chorobotwórczych, to u chorego, u którego wykryto jedynie sekwencje DNA charakterystyczne dla RpA4, obserwowano objawy podobne do zakażenia *R. slovaca*. Także w Rosji, po raz pierwszy wykrywane były inne szczepy niepatogenne: DnS14 i DnS28. Stwierdzono je w kleszczach *D. nutalli*, *D. silvarum* i *D. niveus*. Na podstawie analizy fragmentów DNA wiadomo, że szczepy te są podobne do *R. massiliae* [6, 13, 25, 26, 27].

Badania epidemiologiczne dotyczące występowania niepatogennych gatunków riketsji w kleszczach na terenie Europy wskazują na ich rozprzestrzenienie na całym kontynencie. Potwierdzają to podobne badania przeprowadzone na terenie Polski – obecność riketsji stwierdzono w okolicach Puszczy Białowieskiej, ale także w centralnych i południowych regionach [30, 31]. Są one wykrywane (badania własne NIZP-PZH) u około 20% kleszczy *I. ricinus* i u ponad połowy kleszczy *D. reticulatus*.

7. Ludzka granulocytarna anaplazmoza (ehrlichioza)

Bakterie z rodzaju *Anaplasma phagocytophilum* (dawniej *Ehrlichia phagocytophilum*) jak i *Ehrlichia chaffensis* były uważane za czynnik etiologiczny zakażeń występujących u przeżuwaczy. Stwierdzone w latach 90-tych przypadki występowania choroby o tej etiologii wśród ludzi zapoczątkowały intensywne badania, w wyniku których uległa zmianie systematyka tych bakterii oraz dokładnie poznano właściwości chorobotwórcze i epidemiologię tych zakażeń.

Ehrlichioza jest ostrą chorobą zakaźną wywoływaną przez dwa gatunki bakterii: *Ehrlichia chaffensis* oraz *Anaplasma phagocytophilum*. Gatunki te należą do bezwzględnych pasożytów wewnątrzkomórkowych krwinek białych. *E. chaffensis* bytuje głównie w makrofagach i monocytach wywołując ludzką monocytarną ehrlichiozę (human monocytic ehrlichiosis – HME) występującą na terenie Ameryki Północnej i na Dalekim Wschodzie. *A. phagocytophilum*, odpowiedzialna jest za ludzką granulocytarną anaplazmozę (human granulocytic anaplasmosis – HGA), a znajdowana jest w granulocytach obojętnochłonnych. Przypadki HGA występują zarówno w Europie, jak i W Ameryce Północnej. Wektorem przenoszącym zakażenie *A. phagocytophilum* na człowieka są w kleszcze z rodzaju *Ixodes* (w Europie *I. ricinus*, a w Ameryce Północnej *I. scapularis* i *I. pacificus*). Zakażenie *E. chaffensis* przenoszą kleszcze *Amblyomma americanum*.

Mało charakterystyczne objawy kliniczne HGA stwarzają trudności w prawidłowym ukierunkowaniu badań diagnostycznych. Najczęściej obserwuje się objawy grypopodobne, takie jak wysoka gorączka, bóle mięśni, stawów, osłabienie, bóle i zawroty głowy, wymioty, biegunkę, a także powiększenie wątroby

i śledziony. U części chorych może wystąpić zapalenie płuc z zaburzeniami oddychania, niewydolność nerek oraz objawy neurologiczne z zaburzeniami świadomości. Przebieg zakażenia i nasilenie objawów może mieć różny charakter, od bezobjawowych do bardzo ciężkich przypadków zakończonych zgonem, szczególnie u osób z obniżoną odpornością lub innymi ciężkimi chorobami autoimmunologicznymi oraz u osób starszych. Śmiertelność waha się w granicach 2–10%. W Polsce ludzką granulocytarną anaplazmozę stwierdza się od 2001 roku.

W badaniach dodatkowych często stwierdza się trombocytopenię, leukopenię i podwyższoną aktywność aminotransferaz. W preparacie rozmazu krwi obwodowej barwionym metodą Wrighta lub Giemsy u około 62% chorych w pierwszym tygodniu choroby stwierdza się w badaniu mikroskopowym morule, czyli zlepy komórek w cytoplazmie granulocytów. Rzadziej występuje zwiększony poziom białka CRP.

8. Podsumowanie

Przypadki występowania riketsjoz u ludzi rejestrowane są na całym świecie. Choroby te mają znaczący udział w grupie chorób gorączkowych o nieznanej etiologii. Świadomość ich wystąpienia powinna być zawsze tam, gdzie występują trudne warunki bytowe i związane z nimi zaniedbania sanitarne (grupa durów wysypkowych). Mogą one także stanowić zagrożenie dla osób podróżujących po krajach egzotycznych (liczna grupa zarówna starych jak i nowych gorączek plamistych). Wykrycie w kleszczach na terenie Polski *R. slovaca* i *R. helvetica* wskazuje także na możliwość występowania rodzimych przypadków gorączek plamistych. Pojawianie się nowych chorobotwórczych i niechorobotwórczych riketsji jest wynikiem w znacznym stopniu zwiększenia wykrywalności związanego z rozwojem metod diagnostycznych opartych o techniki molekularne. Coraz większa ich dostępność sprzyja rozwojowi badań ukierunkowanych na wykrywanie i identyfikację czynników chorobotwórczych. Zastosowanie technik molekularnych pozwala także na wykrycie i charakterystykę nowych gatunków, które mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla człowieka i zostać uznane za patogenne w przyszłości.

Piśmiennictwo

1. Bakken J.S., Dumler J.S.: Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 554–560 (2000)
2. Beati L., Humair P. F., Aeschlimann A., Raoult D.: Identification of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in Switzerland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**, 138–148 (1994)
3. Beninati T., Lo N., Noda H., Esposito F., Rizzoli A., Favia G., Genchi C.: First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 983–986 (2002)
4. Brouqui P., Wilske B. i wsp.: Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 1108–1132 (2004) (cytowana praca jest dziełem 26 autorów)
5. Christova I., Van De Pol J., Yazar S., Velo E., Schouls L.: Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group Rickettsiae in ticks from Southeastern Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. **22**, 535–542 (2003)
6. Dautel H., Dippel C., Oehme R., Hartelt K., Schettler E.: Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *Int. J. Med. Microbiol.* Suppl **40**, 149–156 (2006)
7. Fournier P-E., Allombert C., Supputamongkol Y., Caruso G., Brouqui P., Raoult D.: Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 816–818 (2004)
8. Fournier P-E., Dumler J.S., Greub G., Zhang J., Wu Y., Raoult D.: Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5456–5465 (2003)
9. Fournier P-E., Roux V., Raoult D.: Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **3**, 839–849 (1998)
10. Gouriet F., Rolain J.M., Raoult D.: *Rickettsia slovaca* infection, France. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 521–523 (2006)
11. Márquez F.J., Muniain M.A., Soriguer R.C., Izquierdo G., Rodríguez-Bańo J., Borobio M.V.: Genotypic identification of an undescribed spotted fever group rickettsia in *Ixodes ricinus* from southwestern Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**, 0–7 (1998)
12. McDade J.E., Shepard C.C., Redus M.A., Newhouse V.F., Smith J.D.: Evidence of Rickettsia prowazekii infections in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **29**, 277–284 (1980)
13. Nijhof A.M., Bodaan C., Postigo M., Nieuwenhuijs H., Opsteegh M., Franssen L., Jebbink F., Jongejan F.: Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**, 5–95 (2007)
14. Nilsson K., Jaenson T.G., Uhnoo I., Lindquist O., Pettersson B., Uhlén M., Friman G., PÍhlson C.. Characterization of a spotted fever group Rickettsia from *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3–7 (1997)
15. Nilsson K., Lindquist O., Liu A.J., Jaenson T.G., Friman G., PÍhlson C.: *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J. Clin.Microbiol.* **37**, 400–403 (1999)
16. Nilsson K., Lindquist O., PÍhlson C.: Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet*, **354**, 1169–1173 (1999)
17. Paddock C.D., Childs J.E.: *Ehrlichia chaffensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 37–64 (2003)
18. Parola P., Beati L., Cambon M., Raoult D.: First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 95–100 (1998)
19. Parola P., Davoust B., Raoult D.: Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res.* **36**, 469–492 (2005)
20. Parola P., Paddock C.D., Raoult D.: Tick-borne rckettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol Rev.* **18**, 719–756 (2005)
21. Raoult D., Ndihokubwayo J.B., Tissot-Dupont H., Roux V., Faugere B., Abegbinni R., Birtles R.J.: Outbreak of epide-

mic typhus associated with trench fever in Burundi. *Lancet*, **352**, 353–358 (1998)
22. Roux V., Fournier P-E., Raoult D.: Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequening and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2058–2065 (1996)
23. Roux V., Raoult D.: Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsiae* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1449–1445 (2000)
24. Roux V., Rydkina E., Eremeeva M., Raoult D.: Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 252–2061 (1997)
25. Rydkina E., Roux V., Rudakov N., Gafarova M., Tarasevich I., Raoult D.: New *Rickettsiae* in ticks collected in territories of the former soviet union. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 811–814 (1999)
26. Sekeyová Z., Roux V., Xu W., Rehácek J., Raoult D.: *Rickettsia slovaca* sp. nov., a member of the spotted fever group rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **48**, 1455–1462 (1998)
27. Shpynov S., Fournier P-E., Rudakov N., Tankibaev M., Tarasevich I., Raoult D.: Detection of a Rickettsia closely related to *Rickettsia aeschlimanni*, "*Rickettsia heilongjiangensis*", *Rickettsia* sp. strain RpA4 and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan. *J Clin Microbiol*. **42**, 2221–2223 (2004)
28. Siuda K.: Kleszcze (acari: *Ixodida*) Polski. Wyd. Naukowe PWN, Wrocław, 1993, s. 173–203.
29. Skarphédinsson S., Lyholm B.F., Ljungberg M., Søgaard P., Kolmos H.J., Nielsen L.P.: Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish Ixodes ricinus ticks. *APMIS,* **115**, 225–230 (2007)
30. Stańczak J.: Detection of spotted fever group (SFG) rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* (*Acari: Ixodidae*) in Poland. *Int. J. Med. Microbiol*. **40**, 144–148 (2006)
31. Stańczak J.: The occurrence of Spotted Fever Group (SFG) Rickettsiae in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in northern Poland. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. **1078**, 512–514 (2006)
32. Tarasevich I.V., Mediannikov O.Y.: Rickettsial diseases in Russia. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. **1078**, 48–59 (2006)
33. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., Kondrusik M., Hermanowska-Szpakowicz T., Sawicki W., Sułek K.: First cases of acute Human Granulocytic Ehrlichiosis in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 196–198 (2001)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 313–316
http://www.pm.microbiology.pl

CLOSTRIDIUM DIFFICILE: PO 30 LATACH BADAŃ NADAL ZASKAKUJE

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Gayane Martirosian

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Medyków 18, 40-752 Katowice, tel. (32) 252 60 75
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Warszawie
e-mail: gmartir@slam.katowice.pl; gmartir@ib.amwaw.edu.pl

1. Wprowadzenie. 2. Sytuacja epidemiologiczna 3. Czynniki wirulencji 4. Podsumowanie

***Clostridium difficile:* still surprising after 30 years**

Abstract: The first paper that established the etiological role of *Clostridium difficile* in pseudomembranous colitis was published in the New England Journal of Medicine in March 1978. Since 2000, the epidemiology and clinical severity of *C. difficile*-associated diseases changed dramatically, especially in North America and Europe, with the emergence of a new hypervirulent strain NAP1/027. The epidemiology, pathomechanisms, clinical manifestations and treatment problems of infections caused by this hypervirulent strain of *C. difficile* are analyzed in this paper according to recently published data.

1. Introduction. 2. Epidemiological situation. 3. Virulence factors. 4. Conclusions

Słowa kluczowe: *Clostridium difficile*, NAP1/027, epidemiologia
Key words: *Clostridium difficile*, NAP1/027, epidemiology

1. Wprowadzenie

W 2008 roku mija 30 lat od dnia, kiedy w *New England Journal of Medicine* ukazał się pierwszy artykuł autorstwa zespołu J o h n a B a r t l e t t a na temat roli *Clostridium difficile* w etiologii rzekomobłoniastego zapalenia jelit [1]. W tymże 1978 roku ten sam zespół w czasopiśmie *Lancet* opublikował pracę na temat skuteczności wankomycyny w leczeniu przypadków zakażeń *C. difficile* [7]. Podobne wyniki uzyskali w tym czasie także autorzy brytyjscy. Jednocześnie w *Lancet* ukazały się artykuły na temat skuteczności metronidazolu w leczeniu CDAD (*C. difficile* – associated disease) [5, 11]. Pierwsze randomizowane badania na ten temat zostały opublikowane w 1983 roku [20]. Dopiero w 1996 roku ukazała się pierwsza praca opisująca porównywalną skuteczność metronidazolu i wankomycyny w leczeniu CDAD [21]. Pojawiły się także artykuły sugerujące konieczność ograniczenia stosowania wankomycyny ze względu na wzrost liczby szczepów wankomycynoopornych enterokoków (VRE) [3]. W 1997 roku American College of Gastroenterology przedstawił rekomendacje zalecające stosowanie metronidazolu w większości przypadków CDAD i tylko w nielicznych, o bardzo ciężkim przebiegu klinicznym, zalecano stosowanie wankomycyny. Przez szereg lat ostatniej dekady XX wieku nie było powodów do poszukiwań nowych leków skutecznych w leczeniu CDAD. Dopiero z początkiem XXI wieku narastająca liczba przypadków spowodowanych hyperwirulentnym szczepem NAP1/027 opornym na fluorochinolony, stała się impulsem do poszukiwania nowych leków. Szczęśliwie, nie ma jeszcze powodów do obaw przed opornością *C. difficile* na metronidazol i wankomycynę nawet w przypadku hyperwirulentnego szczepu NAP1/027.

C. difficile, sporulująca beztlenowo rosnąca Gram-dodatnia laseczka, wywołuje schorzenia o dość zróżnicowanym przebiegu klinicznym: od samoistnie ustępujących biegunek poantybiotykowych do ciężkich przypadków rzekomobłoniastego zapalenia jelit (PMC – pseudomembranous colitis) [10, 14]. Patogeneza schorzeń związana jest głównie z wysoką toksynotwórczością szczepów. Poprzedzająca biegunki antybiotykoterapia, zwłaszcza klindamycyną i ciprofloksacyną, zaburzająca fizjologiczną florę jelitową, jest uważana za pierwotny czynnik ryzyka rozwoju zakażeń *C. difficile*. Drobnoustrój ten zaliczono do najważniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych, wpływających istotnie na wzrost kosztów hospitalizacji ze względu na dłuższy pobyt pacjentów w szpitalu i wymagane dodatkowe leczenie [9].

Historycznie *C. difficile* łączymy z zakażeniami u pacjentów w starszym wieku, głównie przebywających w domach opieki lub leczonych w oddziałach geriatrycznych. Z końcem XX i początkiem XXI wieku notuje się jednak coraz więcej przypadków zakażeń nie związanych z poprzedzającą antybiotykoterapią i hospitalizacją – są to tak zwane zakażenia pozaszpitalne CA-CDAD (community-associated *C. difficile* – associated disease). Główną przyczyną tych zakażeń jest „hyperwirulentny" epidemiczny szczep *C. difficile*

North American Pulse-field type 1 (NAP1) o rybotypie 027 i toksynotypie III, produkujący toksynę binarną i duże ilości toksyny A i toksyny B. Szczep ten został wyhodowany i opisany po raz pierwszy w Kanadzie. Jest on przyczyną schorzeń o wysokiej zakaźności i śmiertelności.

W ciągu ostatnich 8 lat według danych CDC i ECDC obserwujemy tendencję wzrostu liczby zakażeń szczepem NAP1/027 [2, 6, 8, 15], co sugeruje, że oprócz tradycyjnie uznanych, pojawiły się inne, dotychczas jeszcze nieznane czynniki ryzyka zakażeń, zwłaszcza w przypadkach CA-CDAD. Mamy więc do czynienia ze zjawiskiem podobnym do stwierdzonego w przypadkach zakażeń CA-MRSA (pozaszpitalne zakażenia metycylinoopornym gronkowcem złocistym).

2. Sytuacja epidemiologiczna

Według danych CDC (www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5713a3.htm) w Connecticut od stycznia 2006 roku CA-CDAD wpisano do listy zakażeń podlegających zgłaszaniu [19]. Przypadki podlegające zgłaszaniu zdefiniowano następująco: wystąpienie objawów żołądkowo-jelitowych z pozytywnym testem na obecność toksyn *C. difficile* u osób niehospitalizowanych lub nieleczonych w obiektach służby zdrowia w ciągu 3 poprzedzających miesięcy, lub obecność podobnych objawów u pacjentów w ciągu pierwszych 48 godzin hospitalizacji [11]. Badania przeprowadzone w 2006 roku w 32 szpitalach w Connecticut wykazały, że spośród wszystkich zarejestrowanych przypadków 74% zanotowano u pensjonariuszy domów opieki. Spośród 32 szpitali w 28 (88%) zanotowano, co najmniej po jednym przypadku zakażeń *C. difficile* (od 1 do 23 przypadków). Około 46% pacjentów hospitalizowano celem zdiagnozowania i leczenia biegunki, 12% pacjentów hospitalizowano w oddziałach intensywnej terapii, u 2% pacjentów ze zdiagnozowaną okrężnicą olbrzymią przeprowadzono kolektomię, 2% pacjentów zmarło na skutek komplikacji po zakażeniu *C. difficile*. Czas hospitalizacji pacjentów wahał się od jednego do 39 dni. Analizując sytuację epidemiologiczną w Connecticut zwrócono szczególną uwagę, iż 25% przypadków zakażeń (biegunka najczęściej z domieszką krwi) wystąpiła wśród osób stosunkowo młodych (<45 lat, $p<0,04$), nieleczonych w obiektach służby zdrowia w ciągu 12 miesięcy poprzedzających biegunkę [19]. Liczba zakażeń w Connecticut w 2006 roku stanowiła 6.9 przypadków na 100.000 osób, z dużą przewagą osób w podeszłym wieku. Podobne badania przeprowadzono wcześniej w Wielkiej Brytanii (2004 rok) gdzie odnotowano 22 przypadki na 100.000 osób oraz w Filadelfii (2005 rok) – 7,6 przypadków na 100.000 [4]. We wszystkich badaniach zwrócono uwagę, iż około jedna czwarta przypadków zakażeń wystąpiła u osób bez określonych czynników ryzyka (podeszły wiek i poprzedzająca hospitalizacja). U ponad jednej trzeciej pacjentów, nie zanotowano poprzedzającego leczenia antybiotykami lub chemioterapeutykami. Fakty te świadczą według CDC o konieczności dalszych badań epidemiologicznych oraz prowadzenia dokładnej charakterystyki mikrobiologicznej i genetycznej szczepów *C. difficile* izolowanych z przypadków zakażeń.

Zakażenie *C. difficile* CA-CDAD następuje głównie poprzez bezpośredni kontakt z osobą zakażoną/nosicielem lub poprzez kontakt ze skażonymi przedmiotami środowiska szpitalnego/ambulatoryjnego, lub też poprzez spożywanie skażonej żywności. Hyperwirulentny szczep NAP1/027 wyhodowano z mięsa wołowego sprzedawanego w jednej z hurtowni w Kanadzie [16]. Konieczne są dalsze badania dla wyjaśnienia problemu zakażenia *C. difficile* po spożyciu zainfekowanej żywności.

Możliwość wytwarzania spor jest cechą sprzyjającą przeżywaniu bakterii przez długi czas w środowisku zewnętrznym, poza organizmem człowieka lub zwierzęcia, umożliwiającą dość łatwe rozpowszechnianie się szczepów (głównie drogą fekalno-oralną). Źródłem szczepów *C. difficile* są chorzy z klinicznymi objawami CDAD, bezobjawowi nosiciele (zwłaszcza osoby w starszym wieku), zdrowe noworodki, środowisko szpitalne, zwierzęta (psy, koty, konie, cielęta, noworodki świń, ptaki itd.) [9]. Toksynotwórcze szczepy *C. difficile* izoluje się z kału ok. 70–80% noworodków i niemowląt do 2-ego roku życia. Brak objawów choroby tłumaczy się głównie niedorozwojem układu odpornościowego i brakiem receptorów jelitowych, zwłaszcza dla toksyny A u małych dzieci.

CDAD może manifestować się różnymi objawami: od biegunki o średniej ciężkości do ciężkiego PMC, posocznicą, porażeniem wielonarządowym a nawet śmiercią. Oprócz tradycyjnych metod mikrobiologicznych, w diagnostyce tych schorzeń bardzo pomocny jest wskaźnik poziomu leukocytozy. Przykładowo w jednej z publikacji opisano, iż u połowy z 60 hospitalizowanych pacjentów z leukocytozą o niewyjaśnionej etiologii zdiagnozowano CDAD. Według definicji Amerykańskiego Towarzystwa Chorób Zakaźnych i Epidemiologii jako ciężki przypadek CDAD traktuje się przypadek pacjenta z leukocytozą $>/= 15000/mm^3$ lub wzrostem poziomu kreatyniny ponad 50% powyżej normy. Do przypadków o średniej ciężkości są zaliczane przypadki pacjentów z leukocytozą poniżej $15000/mm^3$ i wzrostem poziomu kreatyniny poniżej niż 1,5-krotny wzrost [14].

W początkowej fazie CDAD obserwuje się objawy nieswoiste, na które warto zwrócić uwagę podczas badań, np. zaczerwienienie śluzówki jelit podczas en-

doskopii lub obecność ognisk zapalnych zlokalizowanych w lewej części okrężnicy. Choroba może przejść w postać ciężką – PMC. Ciężkim przypadkom CDAD towarzyszy gorączka, leukocytoza, hypoalbuminemia i wysokie stężenia CRP. Pacjent z takimi objawami wymaga agresywnej terapii celem prewencji powstawania okrężnicy olbrzymiej, perforacji jelit i patologii wielonarządowej [14]. W przypadku pacjentów z ciężkim przebiegiem zakażenia zalecana jest terapia wankomycyną, ponieważ farmakokinetyka wankomycyny warunkuje mniejsze prawdopodobieństwo powstawania powikłań. Ze względu na to, że nie istnieje jeszcze możliwość szybkiego typowania *C. difficile* celem wykazania obecności szczepów NAP1/027, w każdym przypadku ciężkiej postaci zakażenia należy stosować wankomycynę. W kwietniu 2008 roku w czasopiśmie *Clinical Infectious Diseases* ukazał się artykuł J a c q u e s' a P e p i n' a pod tytułem: „Vancomycin for the treatment of *C. difficile* infection: for whom is this expensive bullet really magic?" [14]. Autor, analizując wyniki wszystkich dotychczasowych badań dotyczących leczenia CDAD dochodzi do wniosku, że stosowanie tak drogiego antybiotyku (koszt leczenia wankomycyną wynosi ok. 400 $, metronidazolem tylko 20 $) ma sens tylko w ciężkich przypadkach CDAD, natomiast w pozostałych zalecane jest rozpoczęcie leczenia od podawania metronidazolu [14].

3. Czynniki wirulencji

C. difficile produkuje dwie duże białkowe toksyny: toksynę A (TcdA) – enterotoksynę o wielkości 308 kDa i toksynę B (TcdB) – cytotoksynę o wielkości 270 kDa, które są glikozylotransferazami, oraz toksynę binarną, pełniącą funkcję rybozylotransferazy. Toksyna binarna występuje u ~10% szczepów *C. difficile,* działa wewnątrzkomórkowo, modyfikuje cząsteczki aktyny [9]. Opisano szczepy *C. difficile* posiadające tylko toksynę binarną (TcdA-/TcdB-/binarna+), której rola w patogenezie zakażeń *C. difficile* nie jest do końca wyjaśniona. Przez ostatnie lata opisano szczepy *C. difficile* posiadające toksynę B przy braku toksyny A (TcdA-/TcdB+). Wykazano epidemiczne znaczenie tych szczepów i udowodniono, że szczepy te mają identyczną delecję w genach kodujących toksynę A. W zależności od kombinacji trzech toksyn produkowanych przez *C. difficile* zidentyfikowano siedem głównych typów: A+B+CDT-, A-B+CDT-, A-B+CDT+, A+B-CDT+, A+B+CDT+, A-B-CDT+, A-B-CDT-[17].

Geny, kodujące toksyny A i B (*tcdA* i tcdB) są zlokalizowane w regionie chromosomalnym, zwanym PaLoc (Pathogenicity Locus) o wielkości 19000 par zasad (w nietoksynotwórczym szczepie tylko 115 par zasad). Są tutaj także 3 dodatkowe geny, spełniające funkcje regulatorowe i transportowe (tcdD, *tcdE* i *tcdC*). W szczepach *C. difficile* NAP1/027 wykryto toksynę binarną i delecję o wielkości 18-bp w *tcdC* (negatywny regulator toksynotworzenia), a także dodatkową delecję pojedynczych par zasad w pozycji 117 [17].

Toksynotypy szczepów *C. difficile* zdefiniowano na podstawie wykrywanych identycznych zmian w PaLoc. Toksynotypowanie oparte jest na metodzie RFLP-PCR. Po amplifikacji PaLoc o wielkości 19 kpz otrzymuje się 10 fragmentów, które porównuje się z fragmentami referencyjnego szczepu VPI 10463. Każdy gen kodujący toksynę wykazuje 3 fragmenty korespondujące z domeną katalityczną (A1 i B1), translokacyjną (A2 i B2) i powtarzalną (A3 i B3). Amplifikacja wszystkich 10 fragmentów jest bardzo pracochłonna, dlatego też do celów skryningowych stosuje się zaproponowaną przez R u p n i k i wsp. metodę wykrywania dwóch najbardziej zmiennych fragmentów: B1 odtwarzającego część 5' w *tcdB* i A3, kodującego część 3' *tcdA* [18]. Wzory restrykcyjne HincII/AccI(B1) i EcoRI (A3) decydują o określanych 7 rodzajach wzorów restrykcyjnych B1 HincII/AccI i 11 typach wzorów A3 EcoRI (http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox). Jeżeli zostaje opisany dotychczas nieznany wzór restrykcyjny, określa się go jako nowy toksynotyp szczepu i poddaje się szczegółowej analizie cały jego PaLoc. Wzorcowy szczep VPI 10463 reprezentuje toksynotyp 0. Znane są dotychczas 24 toksynotypy (I–XXIV) różniące się zmianami w PaLoc w postaci delecji, insercji lub mutacji punktowych. Generalnie 3 rodzaje mutacji dominują w PaLoc szczepów *C. difficile*: delecje dominują w *tcdA*, nie są opisane w *tcdB*, mutacje punktowe są bardziej charakterystyczne dla *tcdB*.

4. Podsumowanie

W tegorocznym marcowym numerze *PLoS One* (www.plosone.org) ukazał się artykuł angielskich badaczy pod tytułem „Clinical severity of *C. difficile* PCR ribotype 027: a case-case study" [13], opisujący przeprowadzoną retrospektywną analizę 123 przypadków zakażeń *C. difficile* zdiagnozowanych w ciągu 2006 roku w szpitalach wschodniej Anglii. W analizie statystycznej testem dla wielu zmiennych porównującej ciężkość zakażeń w zależności od wieku, płci, poprzedzającego leczenia szpitalnego w ciągu ostatnich 60 dni udowodniono, że szczep 027 nie wydaje się różnić stopniem zjadliwości od pozostałych nienależących do rybotypu 027. Autorzy tego artykułu, podsumowując wyniki swojej analizy, zakwestionowali wyolbrzymienie znaczenia szczepów o rybotypie 027 w ciężkich przypadkach zakażeń *C. difficile* w Ameryce

Północnej i Europie, szeroko opisywane ostatnio w literaturze medycznej. W związku z powyższym można stwierdzić, że tylko dalsze badania mikrobiologiczne, kliniczne i genetyczne wyjaśnią przyczyny ciężkich zakażeń *C. difficile*, a także rolę określonych patotypów w tych zakażeniach.

Piśmiennictwo

1. Barlett J.G., Chang T.W., Gurwith M., Gorbach S.L., Onderdonk A.B.: Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.* **298**, 2531–534 (1978)
2. Burckhardt F., Friedrich A., Beier D., Eckmanns T.: *Clostridium difficile* surveillance trends, Saxony, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14** (4), 691–692 (2008)
3. Centers for Disease Control and Prevention: Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Recommendation of the Hospital Infection Control Practices Committee. *Morb. Mortal. Wkly Rep*. **44**, (RR-12) 1–13 (1995)
4. Centers for Disease Control and Prevention: Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk-four states, 2005. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* **54**, 1201–1205 (2005)
5. Dinh H.T., Kernbaum S., Frottier J.: Treatment of antibiotic-induced colitis by metronidazole. *Lancet*, **1**, 338–339 (1978)
6. Fenner L., Widner A.F., Stranden A., Concelmann M., Goorhuis A., Harmanus C., Kuijper E.J., Frei R.: First cluster of clindamycin-resistant *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Switzerland. *Clin. Microbiol. Infect*. **14**, 514–517 (2008)
7. Keighley M.R., Burdon D.W., Arabi Y., Williams J.A., Thompson H., Youngs D., Johnson M., Bertley S., George R.H., Mogg G.A.: Randomised controlled trial of vancomycin for pseudomembranous colitis and postoperative diarrhea. *Br. Med. J*. **2**, 1667–1669 (1978)
8. Kuipers E.J., Surawicz C.M.: *Clostridium difficile* infection. *Lancet*, **371**, 1486–1488 (2008)
9. Martirosian G.: *Clostridium difficile*: do czego zmierzamy? (w:) Postępy w medycynie zakażeń, red. W. Hryniewicz, Letter Quality, Warszawa, 2006, s. 65–71
10. Martirosian G., Szczęsny A., Silva J.Jr.: Analysis of *C. difficile*-associated diarrhea in tertiary care academic hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. **52**, 153–155 (2005)
11. Matuchansky C., Aries J., Maire P.: Metronidazole for antibiotic associated pseudomembranous colitis. *Lancet*, **2**, 580–581 (1978)
12. McDonald L.C., Coignard B., Dubberke E., Song X., Hpran T., Kutty P.K.: Recommendations for surveillance of *Clostridium difficile*-associated disease. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **28**, 140–145 (2007)
13. Morgan O.W., Rodrigues B., Elston T., Verlander N.Q., Brown D.F.J., Brazier J., Reacher M.: Clinical severity of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: a case-case study. *PLoS ONE*, **3** (3): e1812 (2008)
14. Pepin J.: Vancomycin for the treatment of *Clostridium dificile* infection: for whom is this expensive bullet really magic? *Clin. Infect. Dis*. **46**, 1493–1497 (2008)
15. Pepin J., Valiquette L., Cossette B.: Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associates disease during an epidemic cause by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ*, **173**, 1037–1041 (2005)
16. Rodrigues-Palacios A., Staempfli H., Duffielf T., Weese J.S.: *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg. Infect. Dis*. **12**, 485–487 (2007)
17. Rupnik M.: Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol. Rev*. **32**, 541–555 (2008)
18. Rupnik M., Avesani V., Janc M., Eichel-Streiber C., Delmee M.: A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J. Clin. Microbiol*. **36**, 2240–2247 (1998)
19. Surveillance for community-associated *Clostridium difficile* – Connecticut, 2006. *Morb. Mortal. Wkly Rep*. **57 (13)**, 340–343 (2008)
20. Teasley D.G., Gerding D.N., Olson M.M., Peterson L.R., Gebhard R.L., Schwartz M.L., Lee J.T.Jr.: Prospective randomized trial of metronidazole versus vancomycin for *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Lancet*, **2**, 1043–1046 (1983)
21. Wenisch C., Parschalk B., Hasenhundl M., Hirschl A.M., Graninger W.: Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis*. **22**, 813–818 (1996)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 317–324
http://www.pm.microbiology.pl

CORYNEBACTERIUM SPP. – PROBLEM NIE TYLKO DIAGNOSTYCZNY

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Agnieszka Mikucka

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel. (52)585 34 81, e-mail: a.mikucka@cm.umk.pl

1. Wstęp. 2. Systematyka rodzaju. 3. *Corynebacterium* spp. – charakterystyka. 4. Identyfikacja. 5. Diagnostyka mikrobiologiczna. 6. Znaczenie kliniczne. 7. Lekowrażliwość. 8. Podsumowanie

***Corynebacterium* spp. – not only a diagnostics problem**

Abstract: *Corynebacterium* species are rare and difficult to identify in the clinical microbiology laboratories. In this article, diseases attributed to these bacteria, current taxonomy, isolation procedures, methods for identification and antimicrobial susceptibility testing as well as the when these bacteria should be identified to the species level are describet.

1. Introduction. 2. Taxonomy of the genus. 3. Description of the *Corynebacterium* spp. 4. Identification. 5. Microbiological diagnostics. 6. Clinical significance. 7. Drug – sensitivenes. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Corynebacterium*, coryneform, diagnostyka, znaczenie kliniczne
Key words: *Corynebacterium*, coryneform, diagnostics, clinical significance

1. Wstęp

Mimo, że upłynęło ponad ćwierć wieku od ukazania się pierwszych wytycznych CDC (Centers for Disease Control) [wg 15] na temat identyfikacji Gram-dodatnich pałeczek z grupy coryneform, w wielu laboratoriach są one identyfikowane jedynie do rodzaju lub pomijane. Nadal też, ocena udziału w zakażeniach oportunistycznych gatunków *Corynebacterium* spp. i innych coryneform bakterii ściśle wiąże się z możliwościami diagnostycznymi, tj. wiedzą mikrobiologa i metodami, jakimi dysponują laboratoria.

Po publikacji CDC [wg 15] ukazało się kilka opracowań na temat coryneform bakterii [9, 13, 15, 21], w których szczegółowo opisano metody identyfikacji tych drobnoustrojów oraz ich udział w zakażeniach u człowieka. W ciągu ostatnich dwóch dekad w piśmiennictwie anglojęzycznym pojawiło się wiele publikacji, których autorzy opisują przypadki zakażeń z udziałem *Corynebacterium* spp. [1, 4, 11, 19, 23, 29, 33, 48], lekowrażliwość [16, 18, 22, 24, 44, 45] i epidemiologię coryneform bakterii [23, 30, 33, 39]. W dostępnym piśmiennictwie polskim na temat coryneform bakterii jest niewiele publikacji [5, 20, 26, 27, 29, 31, 37, 48, 49]. Ponadto, dopiero niedawno w jednym z podręczników [41] wprowadzono określenie „coryneform", od dawna stosowane na świecie i zrozumiałe dla specjalistów.

Postęp medycyny w zakresie diagnostyki i leczenia chorób paradoksalnie przyczynia się do wzrostu zakażeń oportunistycznych u chorych z obniżoną odpornością, dla których zagrożenie stanowią drobnoustroje należące do mikroflory fizjologicznej człowieka, m.in. *Corynebacterium* spp. Współcześnie, nie wątpi się w znaczenie koagulazo-ujemnych gronkowców w zakażeniach związanych np. z biomateriałami, czy udziału enterokoków w różnych postaciach zakażeń szpitalnych. Uznanie Gram-dodatnich maczugowatych pałeczek za przyczynę oportunistycznych zakażeń szpitalnych jest trudniejsze – bakterie te mogą być izolowane prawie ze wszystkich próbek klinicznych, ponieważ powszechnie występują na skórze i błonach śluzowych człowieka. Ponadto coryneform bakterie, a także *Corynebacterium* spp. charakteryzuje zróżnicowanie cech morfologicznych i biochemicznych, niespotykane wśród innych grup drobnoustrojów. Polimorfizm, różne wymagania odżywcze w obrębie rodzaju oraz czas hodowli dodatkowo utrudniają diagnostykę.

Zakażenia z udziałem oportunistycznych gatunków *Corynebacterium* spp. należą do rzadkich, stąd prawdopodobnie ich diagnostyka stwarza wiele trudności. Niejednokrotnie problem stanowi ich hodowla, identyfikacja, a przede wszystkim ocena lekowrażliwości. Mimo, że znaczenie kliniczne coryneform bakterii nadal budzi wiele kontrowersji, to niezaprzeczalna jest też potrzeba jasnych rekomendacji dotyczących diagnostyki zakażeń z udziałem tych drobnoustrojów.

2. Systematyka rodzaju

Coryneform (gr. *coryne* – maczuga, ang. *form* – kształt) bakterie to Gram-dodatnie, nieregularne, niekwasooporne pałeczki związane z zakażeniami u człowieka. Do grupy tej oprócz *Corynebacterium* (gr. *coryne* – maczuga, *bakterion* – małe pałeczki) należą

Tabela I

Oportunistyczne gatunki *Corynebacterium* spp. o znaczeniu klinicznym [4, 7, 8, 12, 14, 17, 32, 35, 36, 38, 47]

Często izolowane	Rzadko izolowane	Opisano pojedyncze szczepy
*C. amycolatum**	***C. accolens****	*C. appendicis*
CDC group F-1*	*C. afermentans* subsp. *afermentans*	*C. atypicum*
CDC group G*	***C. afermentans* subsp. *lipophilum****	*C. aurimucosum*
C. glucuronolyticum	*C. argentoratense*	*C. freneyi*
C. jeikeium*	*C. auris*	*C. hansenii*
C. macginleyi*	***C. bovis*****	*C. lipophiloflavum*
*C. minutissimum**	*C. confusum*	*C. resistens*
C. nigricans	*C. coyleae*	*C. sanguinis*
C. pseudodiphtheriticum	*C. durum*	*C. simulans*
C. riegelii	*C. falsenii*	*C. singulare*
*C. striatum**	*C. imitans*	*C. sundsvallense*
C. urealyticum*	*C. kroppenstedtii*	*C. tuscaniae*
	*C. matruchotii***	*C. uricelerivorans*
	C. mucifaciens	
	C. mycetoides	
	C. propinquum	
	*C. thomssenii***	
	C. tuberculostearicum**	
	C. xerosis	

* – gatunki najczęściej izolowane w badaniach własnych
** – gatunki bardzo rzadko izolowane
pogrubioną czcionką zaznaczono gatunki lipofilne

obecnie: *Turicella*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dermabacter*, *Rothia*, *Exiguobacterium*, *Oerskovia*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Leifsonia*, *Arcanobacterium* [4, 14].

Rodzaj *Corynebacterium* należy do klasy *Actinobacteria*, rzędu *Actinomycetales*, podrzędu *Corynebacterineae*, rodziny *Corynebacteriaceae*. Rodzaj zawiera obecnie 72 gatunki, w tym 43 o znaczeniu klinicznym (tab. I), a 29 niezwiązanych z zakażeniami u człowieka jest izolowanych od zwierząt, roślin i ze środowiska: *C. ammoniagenes*, *C. aquilae*, *C. auriscanis*, *C. callunae*, *C. camporealense*, *C. capitovis*, *C. casei*, *C. caspium*, *C. ciconiae*, *C. cystitidis*, *C. efficiens*, *C. felinum*, *C. flavescens*, *C. glaucum*, *C. glutamicum*, *C. halotolerans*, *C. kutcheri*, *C. mastitidis*, *C. mooreparkense*, *C. phocae*, *C. pilosum*, *C. renale*, *C. sphenisci*, *C. spheniscorum*, *C. suicordis*, *C. terpenotabidum*, *C. testudinoris*, *C. variabile*, *C. vitaeruminis* [4, 10, 12, 14, 17, 32, 35, 36, 38, 47].

3. *Corynebacterium* spp. – charakterystyka

W metodzie Grama *Corynebacterium* spp. barwią się nierównomiernie. Są to cienkie, zakrzywione pałeczki, czasem kształtem przypominające maczugę (rozszerzone końce). Komórki układają się najczęściej równolegle, palisadowo lub kątowo (formy V, Y) [14, 15].

Corynebacterium spp. mają dobrze zdefiniowane właściwości chemotaksonomiczne, jednak możliwość ich analizy mają tylko ośrodki referencyjne. W odróżnieniu od pozostałych coryneform, w skład ściany komórkowej *Corynebacterium* spp. (z wyjątkiem *C. amycolatum*, *C. kroppenstedtii* i *C. atypicum)* [7, 8, 17] wchodzą krótkołańcuchowe 22–36 – węglowe kwasy mykolowe. Poza głównymi komórkowymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (palmitynowy, oleinowy, stearynowy) obecnymi u wszystkich maczugowców, *C. urealyticum* i *C. confusum* dodatkowo zawierają kwas tuberkulostearynowy [14]. Oprócz kwasu mezodiaminopimelinowego ściana komórkowa *Corynebacterium* spp. zawiera arabinozę i galaktozę. Różnorodność w obrębie rodzaju odzwierciedla zawartość par zasad G+C, która waha się od 46 mol% (u *C. kutcheri*) do 74 mol% (u *C. auris*) [13–15].

Wszystkie gatunki *Corynebacterium* spp. są katalazododatnie. Gatunki o znaczeniu klinicznym są zawsze nieruchliwe i oksydazo-ujemne (z wyjątkiem rzadko izolowanego *C. bovis,* który może być oksydazo-dodatni), nie wytwarzają żelatynazy i bardzo rzadko hydrolizują eskulinę (*C. durum*, *C. glucuronolyticum*, *C. kroppenstedtii*, *C. matruchotii*).

Rodzaj zawiera gatunki lipofilne i nielipofilne oraz fermentujące i niefermentujące [13–15].

4. Identyfikacja

Obecnie, aby opisać nowy gatunek *Corynebacterium* spp. lub przypadek kliniczny z udziałem tych bakterii niezbędne jest wykorzystanie chemotaksonomii, metod fenotypowych i genotypowych [4], chociaż wg

F u n k e i wsp. [14] „złoty standard" w identyfikacji stanowi szczegółowa ocena cech fenotypowych.

W schemacie von G r a e v e n i t z a i F u n k e [15] podstawę identyfikacji coryneform bakterii stanowi morfologia komórki (wynik barwienia metodą Grama) i kolonii (kształt, wielkość, konsystencja, kolor, zapach). Cechy te pozwalają na odróżnienie *Corynebacterium* spp. od innych coryneform bakterii, a nawet wstępne zróżnicowanie niektórych gatunków *Corynebacterium*. Na przykład typowy wygląd maczugowatych, drobnych pałeczek jest charakterystyczny tylko dla *Corynebacterium* spp. (z wyjątkiem *C. durum*, *C. matruchotti*), *Turicella* spp. to długie pałeczki, a kokopałeczki i bardzo krótkie pałeczki tworzy *Arthrobacter* spp. i *Dermabacter* spp. [4, 13–15]. Drobne, gładkie kolonie są charakterystyczne dla gatunków lipofilnych (np. *C. urealyticum*), suche, woskowe z nieregularnym brzegiem są typowe dla *C. amycolatum*, a śluzowe dla *C. mucifaciens* (opisano szczep atypowy) [4, 14]. Tylko nieliczne gatunki tworzą zabarwione kolonie, np. *C. lipophiloflavum* – żółte [14], *C. nigricans* – czarne [38], a jedynie szczepy *Brevibacterium* spp. wydzielają charakterystyczny podobny do sera zapach [4, 14, 15]. Ponadto, wśród gatunków lipofilnych tylko szczepy *C. urealyticum* hydrolizują mocznik w ciągu 5 minut, a β-glukuronidazę wytwarzają jedynie szczepy *C. glucuronolyticum* (synonim *C. seminale*) [14, 15]. Oprócz oceny morfologii schemat identyfikacji von G r a e v e n i t z a i F u n k e [15] zawiera: ocenę obecności katalazy, fermentacji/utleniania cukrów, zdolności ruchu, redukcji azotanów, hydrolizy mocznika (24 godziny), eskuliny (48 godzin), wytwarzania kwasów (48 godzin) z glukozy, maltozy, sacharozy, mannitolu i ksylozy, test CAMP (24 godziny) oraz lipofilności (obfity wzrost na podłożach z 0,1–1% Tween 80) [4, 14]. Cechy te zostały szczegółowo przedstawione [26, 27].

Z wielu dostępnych komercyjnych testów identyfikacyjnych użyteczne w różnicowaniu coryneform mogą być głównie API Coryne (bioMérieux) i Rapid CB Plus (Remel) [14]. Dostępny na polskim rynku test API Coryne umożliwia prawidłową identyfikację gatunków oportunistycznych takich jak: *C. accolens*, CDC group G, *C. glucuronolyticum*, *C. macginleyi*, *C. propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. urealyticum* oraz uznanych patogenów *C. diphtheriae*,

T a b e l a I I

Wybrane cechy najważniejszych klinicznie oportunistycznych gatunków *Corynebacterium* spp. [7, 14, 28, 38]

Gatunek	Morfologia kolonii*	Kod APICoryne	Różnicowanie
C. amycolatum	suche, woskowe, z nieregularnym brzegiem, 1–2 mm	3100325, 3100324	z *C. striatum*, *C. minutissimum*, *C. xerosis* [48, 49]
*C. accolens***	wypukłe, gładkie, drobne, < 0,5 mm	3000305, 3000105	–
C. afermentans subsp. *afermentans* subsp. *lipophilum***	gładkie, okrągłe, 1–1,5 mm wypukłe, gładkie, drobne, < 0,5 mm	2100004, 2100004	z *C. auris, Turicella otitidis* [26, 27] –
CDC group F-1**	wypukłe, gładkie, drobne, < 0,5 mm	2001125, 3001125	gatunek lipofilny fermentujący cukry, ureazo-dodatni
CDC group G**	wypukłe, gładkie, drobne, < 0,5 mm	2100104	z *C. jeikeium* [14, 26, 27], może fermentować fruktozę
C. glucuronolyticum	żółto-białe, wypukłe, gładkie, 1–1,5 mm	2040125, 3240165	wytwarza β-glukuronidazę, ureazę, test CAMP – dodatni, może hydrolizować eskulinę
*C. jeikeium***	wypukłe, gładkie, drobne, < 0,5 mm	2100304, 2100204	z CDC gr. G, nie fermentuje fruktozy
*C. macginleyi***	wypukłe, gładkie, drobne, < 0,5 mm	1100105, 1100115	–
C. minutissimum	błyszczące, okrągłe, wilgotne, 1–1,5 mm	2100135, 2100335, 2100325	z *C. striatum, C. amycolatum, C. xerosis* [48,49], hydrolizuje tyrozynę, wytwarza DNazę
C. nigricans	czarne, okrągłe, szorstkie, 0,5–1,5 mm	2000125, 0000125	–
C. pseudo-diphtheriticum	suche, okrągłe, 1–2 mm po 48 godz.	3101004	–
C. riegelii	wypukłe, okrągłe, błyszczące, czasem kleiste, do 1,5 mm po 48 godz.	0101224, 2001224, 2101224	ureazo-dodatni, fermentuje maltozę (z opóźnieniem)
C. striatum	podobne do gronkowców koagulazo-ujemnych, 1–1,5 mm	3100105, 3100305	z *C. amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. xerosis* [48,49], hydrolizuje tyrozynę
*C. urealyticum***	wypukłe, gładkie, drobne, < 0,5 mm	2001004, 2101004	–

* – morfologia kolonii 24-godzinnej hodowli na podłożu Columbia Agar z 5% krwią baranią,

** – gatunki lipofilne na podłożu z Tween 80 tworzą 24 godzinach kolonie >1 mm

C. pseudotuberculosis i *C. ulcerans* [14, 15, 28]. Identyfikacja *C. amycolatum*, *C. striatum i C. minutissimum* przy pomocy API Coryne wymaga wykonania dodatkowych testów [15, 28]. Schemat różnicowania wymienionych gatunków opisano wcześniej [27, 48, 49]. W identyfikacji pozostałych gatunków *Corynebacterium* spp. ten system identyfikacji może mieć zastosowanie do oceny poszczególnych cech biochemicznych [26, 27]. Należy jednak uwzględnić czas wzrostu poszczególnych gatunków *Corynebacterium* spp. i wydłużyć czas inkubacji w przypadku gatunków lipofilnych do 48 godzin, a wyjątkowo 72 godzin (*C. coyleae* natomiast fermentuje glukozę w ciągu 3–6 dni) [28, 14, 15] (tab. II).

Rapid CB Plus poprawnie pozwala zidentyfikować: *C. confusum*, *C. coyleae*, *C. durum*, *C. jeikeium*, *C. propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, *C. urealyticum* [14].

W chemotaksonomii bardzo przydatne są techniki chromatograficzne (cieczowa, gazowa, cienkowarstwowa) oraz spektrometria masowa, które podobnie jak metody molekularne (rybotypowanie, hybrydyzacja DNA-DNA) nie są dostępne w wielu polskich laboratoriach mikrobiologicznych. Komercyjne systemy identyfikacji – oparte na chromatografii gazowo-cieczowej Sherlock system (MIDI) i analizie 16S rRNA MicroSeq 500 (Perkin-Elmer) są również niedoskonałe i nie umożliwiają rozróżnienia wszystkich gatunków [14, 43].

5. Diagnostyka mikrobiologiczna

W przypadku drobnoustrojów oportunistycznych, należących do mikroflory człowieka określenie ich udziału w procesie chorobowym jest bardzo trudne i zawsze wymaga współpracy mikrobiologa i klinicysty. W odniesieniu do *Corynebacterium* spp. jest to tym trudniejsze, że do niedawna nie było wytycznych odnośnie udziału tych drobnoustrojów w zakażeniach szpitalnych. Coraz liczniejsze, dobrze udokumentowane przypadki kliniczne z udziałem *Corynebacterium* spp. w procesie chorobowym [1, 4, 11, 19, 23, 33], szczególnie w przypadku nowych gatunków [7, 8, 12, 17, 32, 35, 36, 38, 47] oraz określenie grup i czynników ryzyka zakażeń z udziałem coryneform bakterii [3, 31] z pewnością przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat tych drobnoustrojów, a przede wszystkim do wypracowania jasnych reguł postępowania. Według F u n k e i wsp. [14] coryneform bakterie powinny być identyfikowane do gatunku i brane pod uwagę jako czynnik etiologiczny zakażenia w przypadku:

a. izolacji z miejsc fizjologicznie jałowych (np. krew, jeśli nie jest to jedna dodatnia próbka z kilku pobranych); bardzo rzadko szczep izolowany z pojedynczej próbki stanowi czynnik etiologiczny zakażenia (z wyjątkiem przypadków leczonego zapalenia wsierdzia),
b. z odpowiednio pobranych próbek, jeżeli są izolowane w monokulturze lub jako mikroorganizm dominujący,
c. z moczu w ilości 10^4 cfu/ml, jeżeli są izolowane w monokulturze lub $>10^5$ cfu/ml w hodowli mieszanej jako mikroorganizm dominujący.

Udział coryneform bakterii w zakażeniu dodatkowo potwierdza fakt izolacji tego samego szczepu z kilku próbek, obecność coryneform w preparacie bezpośrednim, przy jednoczesnej leukocyturii lub jeżeli w hodowli mieszanej drobnoustroje towarzyszące należą do bakterii saprofitycznych.

Jako mikroflorę fizjologiczną należy potraktować szczepy izolowane z próbek fizjologicznie niejałowych, gdy coryneform są izolowane w równych lub mniejszych ilościach z innymi drobnoustrojami należącymi do mikroflory człowieka.

Do izolacji *Corynebacterium* spp. wystarcza podłoże z 5% krwią baranią (lepszy wzrost na agarze Columbia niż na agarze tryptozowo-sojowym). Hodowle należy jednak przedłużyć do minimum 72 godzin. Do rozważenia pozostaje stosowanie podłóż wybiórczych z fosfomycyną (100 μg/ml) i glukozo-6-fosforanem (12,5 μg/ml) lub furazolidonem (50–100 μg/ml), krążków z fosfomycyną (50 μg) i glukozo-6-fosforanem (50 μg) [15] oraz podłoża lub krążków (200 μg) z mupirocyną [28], na które to związki coryneform wykazują oporność. Niekiedy konieczne jest zastosowanie podłóż specjalnych z 0,1–1% Tween 80 dla gatunków lipofilnych, z uwagi na to, że dla niektórych szczepów bardzo skąpy wzrost uzyskuje się po 72 godzinach na podłożach wzbogaconych krwią [14, 15, 28].

6. Znaczenie kliniczne

Corynebacterium spp. podobnie jak koagulazoujemne gronkowce stanowią istotny składnik stałej mikroflory skóry i błon śluzowych człowieka. Drobnoustroje te nie są jednakowo rozmieszczone na skórze człowieka; bytują w jamie nosowo-gardłowej, krtani, końcowym odcinku jelita cienkiego i w jelicie grubym, w układzie moczowo-płciowym (głównie w pochwie i szyjce macicy), a także worku spojówkowym [14, 20]. Zakażenia o etiologii *Corynebacterium* spp. mają najczęściej charakter endogenny, oportunistyczny. Nieliczne są doniesienia na temat zakażeń egzogennych, kiedy źródłem szczepów może być inny skolonizowany pacjent, personel medyczny lub środowisko szpitalne [30, 33].

Wśród czynników predysponujących do zakażenia o etiologii *Corynebacterium* spp. można wymienić:

Tabela III

Gatunki *Corynebacterium* spp. opisane po 2002 roku* [12, 15, 17, 32, 35, 36, 38, 47]

Gatunek	Rok opisu	Rodzaj materiału/przypadek kliniczny
C. atypicum	2003	Nieznany
C. nigricans	2003	Wymaz z dróg moczowo-płciowych kobiet (ciąża powikłana)
C. sanguinis	2003	Krew
C. tuberculostearicum	2004	Szpik kostny, krew, płyn z otrzewnej, mocz wymaz z cewki moczowej, skóry, z ropnia
C. resistens	2005	Krew, popłuczyny oskrzelowe, wymaz z ropnia
C. tuscaniae	2006	Krew
C. hansenii	2007	Wymaz z kikuta po amputacji kończyny dolnej (tłuszczakomięsak)
C. uricelerivorans	2007	Krew

* – gatunki opisane do 2002 r. przedstawiono wcześniej [26–28]

immunosupresję, długotrwałą i szeroko zakresową antybiotykoterapię, sterydoterapię, zabiegi operacyjne, wiek powyżej 65 lat, choroby podstawowe (choroba niedokrwienna serca, niewydolność nerek, niewydolność oddechowa, cukrzyca), w tym choroby nowotworowe (białaczka, szpiczak mnogi, chłoniak, niedokrwistość plastyczna, rak przewodowy sutka, rak pęcherza moczowego i rak odbytu) oraz urazy wielonarządowe, zakażenia wirusami HIV, CMV i wcześniactwo. Równorzędną rolę odgrywa przerwanie ciągłości skóry i błon śluzowych (cewnikowanie żyły centralnej, pęcherza moczowego, serca i tracheotomia) oraz inwazyjne procedury lecznicze (amputacje, zabiegi urologiczne, transplantacje narządów, szpiku kostnego, mechaniczna wentylacja, hemodializa, dializa otrzewnowa, wszczepianie protez naczyniowych i sztucznych zastawek). Długotrwała hospitalizacja i szeroko zakresowa antybiotykoterapia może wpływać na zmianę w składzie mikroflory skóry i umożliwiać kolonizację przez wyselekcjonowane, wielolekoporne szczepy [1, 3, 16, 20, 22, 28, 31, 33]. Stwierdzono, że izolowane od chorych hospitalizowanych szczepy *Corynebacterium* spp. często charakteryzują się opornością na wiele grup antybiotyków, w odróżnieniu od wielolekowrażliwych szczepów pochodzących od osób nie leczonych w szpitalu [5, 22, 39].

Oportunistyczne gatunki *Corynebacterium* spp. najczęściej są przyczyną zakażeń krwi, zakażeń dróg moczowo-płciowych i zakażeń związanych z biomateriałami [1, 3, 4, 9, 13–15, 21, 23, 26–29, 31, 37, 48] (tabela III).

7. Lekowrażliwość

Do niedawna brak zaleceń CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) sprawiało wiele trudności w ocenie lekowrażliwości *Corynebacterium* spp. Rekomendowaną od 2006 roku przez CLSI [6] metodą oceny lekowrażliwości dla *Corynebacterium* spp. jest metoda mikrorozcieńczeń w bulionie Mueller-Hinton z 2,5–5% krwią końską, zbyt czasochłonna i kosztowna do stosowania w codziennej pracy laboratorium. Korzystniejszym rozwiązaniem jest zastosowanie metody Etest (AB Biodisk), która wykazuje wysoką korelację wartości uzyskanych MIC (Minimal Inhibitory Concentration) z wartościami otrzymanymi metodą referencyjną [61]. Producent Etestów zaleca do oceny lekowrażliwości *Corynebacterium* spp. podłoże Mueller-Hinton Agar z 5% krwi baraniej, zawiesinę bakteryjną o gęstości 1 McFarland oraz przeprowadzanie inkubacji w temperaturze 35°C w atmosferze wzbogaconej 5% CO_2 (w razie potrzeby) przez 24–48 godzin [46]. Kryteria umożliwiające interpretację wartości MIC uzyskanych dla *Corynebacterium* spp. w dokumencie CLSI podano dla β-laktamów (penicylina, cefotaksym, ceftriakson, cefepim, imipenem, meropenem), tetracyklin (tetracyklina, doksycyklina), wankomycyny, daptomycyny, gentamicyny, erytromycyny, klindamycyny, ciprofloksacyny, trimetoprimu-sulfametoksazolu, rifampicyny, quinuprostiny-dalfopristiny i linezolidu [6].

W minionej dekadzie ukazała się ograniczona liczba prac na temat wrażliwości coryneform na antybiotyki i chemioterapeutyki. Zaledwie kilka ujmuje ten temat w sposób kompleksowy, większość dotyczy zazwyczaj tylko kilku wybranych antybiotyków lub gatunków [16, 18, 21, 24, 29, 40, 45].

Wielolekooporność jest prawdopodobnie głównym czynnikiem ułatwiającym *Corynebacterium* spp. kolonizację skóry, biomateriałów, utrzymywanie się w środowisku szpitalnym i udział w zakażeniach [1, 5, 28, 22, 30]. *Corynebacterium* spp. wykazują oporność na beta-laktamy, makrolidy, linkozamidy, chinolony, aminoglikozydy, kwas fusydowy i tetracyklinę [13–15, 26–29]. Najczęściej wielolekoporne są szczepy z gatunku *C. jeikeium*, *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. resistens* [13–15, 26–29, 32], rzadziej *C. striatum* i CDC grupa G [14, 33], w badaniach własnych również *C. afermentans* subsp. *lipophilum* [28, 29].

Szczepy wielolekooporne pozostają wrażliwe na glikopeptydy (wankomycyna i teikoplanina), linezolid, rimfapicynę oraz często na doksycyklinę, minocyklinę i tigecyklinę [13–15, 26–29, 32]. W badaniach własnych otrzymany zakres wartości MIC glikopeptydów dla szczepów *Corynebacterium* spp. był wyższy (wankomycyna 0,19–1,5 µg/ml, teikoplanina 0,25–2 µg/ml) w porównaniu do dotychczas opisywanych [24, 40], co sugeruje ryzyko narastania oporności na glikopeptydy w tej grupie pałeczek w Polsce. Opisano już oporne na wankomycynę szczepy *Corynebacterium* spp. [2] i *Brevibacterium* spp. [45] oraz wykryto u coryneform gen *vanA* [34]. Wartości MIC uzyskiwane dla linezolidu są kilkakrotnie niższe [18] (nie przekraczały MIC 0,2 µg/ml w badaniach własnych) w porównaniu do MIC glikopeptydów.

Mechanizm nabywania oporności przez *Corynebacterium* spp. pozostaje niewyjaśniony ale najbardziej prawdopodobną hipotezą jest nabywanie przez nie oporności od pałeczek Gram-ujemnych w układzie pokarmowym, a następnie stopniowa kolonizacja skóry [22, 39]. Przypuszcza się, że wielolekooporność *Corynebacterium* spp. związana jest prawdopodobnie z zaburzeniami w przepuszczalności ściany komórkowej [15].

U wielolekoopornego szczepu *C. jeikeium* opisano białko błonowe MatE, które odpowiada za mechanizm wypompowywania i należy do rodziny białek MATE (multidrug and toxic compound extrusion) chroniących komórkę przed antybiotykami i innymi toksycznymi czynnikami. Prawdopodobnie zespoły białek (NorM, DinF) z rodziny MATE są w głównej mierze odpowiedzialne za wielolekooporność szczepów *C. jeikeium* [42].

Dotychczas najszerzej opisano geny warunkujące oporność na makrolidy, linkozamidy, tetracykliny i chloramfenikol [26]. Fenotyp MLS_B, tj. oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B determinowany jest obecnością genu *erm*(X). Przypuszcza się, że fenotyp ten jest nabywany od szczepów posiadających naturalną oporność tego typu, kolonizujących skórę i błony śluzowe. Gen *erm*(X) może być zlokalizowany w transpozonie (np. Tn*5432* u *C. xerosis*), w plazmidzie (np. pNG2 u *C. diphtheriae*) lub zintegrowany z chromosomem (np. *C. jeikeium*, *C. striatum*) [42].

8. Podsumowanie

Od czasu ukazania się pierwszych publikacji na temat *Corynebacterium* spp. nastąpił znaczny postęp w wiedzy o tych bakteriach oraz wypracowano pewne zalecenia dotyczące identyfikacji, oceny lekowrażliwości i określenia udziału w procesie chorobowym pałeczek z grupy coryneform. Nadal jednak identyfikacja i ocena lekowrażliwości *Corynebacterium* spp. są problematyczne. Precyzyjna identyfikacja wielu nowych gatunków *Corynebacterium* spp. nie jest możliwa w większości laboratoriów polskich. Nadal pozostaje nierozstrzygnięta możliwość stosowania metody krążkowo-dyfuzyjnej dla coryneform. Metoda ta coraz częściej jest niewystarczająca do oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów wielolekopornych, a niewykluczone, że również dla coryneform nie znajdzie ona zastosowania. Proponowane podłoże Mueller-Hinton z krwią końską lub baranią nie zawsze jest wystarczające do uzyskania wzrostu gatunków lipofilnych (wzrost po 96 godzinach lub brak wzrostu). Może należałoby zróżnicować metodę i zamiast ogólnie rekomendowanego, dla niewymagających gatunków *Corynebacterium* spp. stosować podłoże Mueller-Hinton Agar, a dla lipofilnych – podłoże Mueller-Hinton Agar z Tweenem 80. Wprawdzie dodanie Tween 80 prawdopodobnie utrudnia dyfuzję antybiotyków [50], co wyraża się w wyższych wartościach MIC glikopeptydów na podłożu z dodatkiem Tween 80 niż na podłożu z krwią baranią, jednak w niektórych przypadkach umożliwia wzrost lipofilnych *Corynebacterium* spp. lub znacznie skraca czas oczekiwania na wynik. Zastosowanie innego podłoża niż dotychczas proponowane z pewnością wymagałoby zmiany kryteriów interpretacji uzyskanych wyników.

Na obecnym poziomie wiedzy optymalną propozycją, możliwą do zastosowania w laboratoriach szerokoprofilowych, wydaje się oznaczanie lekowrażliwości *Corynebacterium* spp. metodą E-testów dla glikopeptydów i linezolidu, na które drobnoustroje te wykazują wrażliwość a jednocześnie antybiotyki te najczęściej uwzględniane są w terapii empirycznej. Jednak konieczne jest monitorowanie narastania oporności na antybiotyki również wśród coryneform.

Piśmiennictwo

1. Balci I., Eksi F., Bayram A.: *Coryneform* bacteria isolated from blood cultures and their antibiotic susceptibilies. *J. Int. Med. Res*. **30**, 422–429 (2002)
2. Barnass S., Holland K., Tabaqchali S.: Vancomycin-resistant *Corynebacterium* species causing prosthetic valve endocarditis successfully treated with imipenem and ciprofloxacin. *J. Infect.* **10**, 161–1699 (1991)
3. Belmares J., Detterline S., Park J. B., Parada J.P.: *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcomes. *BMC Infect. Dis.* **7**, 4 (2007)
4. Bernard K.: *Corynebacterium* species and Coryneforms: an Update on Taxonomy and Diseases attributed to These Taxa. *Clin. Microbiol. News*, **2**, 9–18 (2005)
5. Ciok-Pater E., Mikucka A., Gospodarek E.: Porównanie wrażliwości na antybiotyki lipofilnych gatunków *Corynebacterium* spp. izolowanych od chorych w dniu przyjęcia do szpitala i podczas hospitalizacji. *Med. Dośw. Microbiol*. **1**, 19–28 (2005)

6. Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline, M45-A, Vol. 26, No. 19, 2006, s. 18–19
7. Collins M.D., Burton R.A., Jones D.: *Corynebacterium amycolatum* sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiol. Lett*. **3**, 349–352 (1988)
8. Collins M.D., Falsen E., Akervall E., Sjöden B., Alvarez A.: *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel *Corynebacterium* that does not contain mycolic acids. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **48**, 1449–1454 (1998)
9. Coyle M.B., Lipsky B.A.: Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev*. **3**, 227–246 (1990)
10. Fernández-Garayzábal J.F., Vela A.I., Egido R., Hutson R.A., Lanzarot M.P., Fernández-García M., Collins M.D.: *Corynebacterium ciconiae* sp. nov., isolated from the trachea of black storks (*Ciconia nigra*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **54**, 2191–2195 (2004)
11. Fernández-Natal M.I., Soriano F. i wsp. The isolation of *Corynebacterium coyleae* from clinical samples: clinical and microbiological data. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. **27**, 177–184 (2008) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
12. Feurer C., Clermont D., Bimet F., Candréa A., Jackson M., Glaser P., Bizet C., Dauga C.: Taxonomic characterization of nine strains isolated from clinical and environmental specimens, and proposal of *Corynebacterium tuberculostearicum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1055–1061 (2004)
13. Funke G., Bernard K.A.: Coryneform gram-positive rods. *J. Clin. Microbiol*. **7**, 319–345 (1999)
14. Funke, G., Bernard K.A.: Coryneform Gram-Positive Rods. (w:) Manual of Clinical Microbiology, red. P.R. Murray, Clinical Center, National Institutes of Health, Washington, 8th edition, 2003, s. 472–501
15. Funke G., Graevenitz A., Clarridge III J.E., Bernard K.A.: Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev*. **1**, 125–159 (1997)
16. Funke G., Pünter V., Graevenitz A.: Antimicrobial Susceptibility Patterns of Some Recently Established Coryneform Bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **12**, 2874–2878 (1996)
17. Hall V., Collins M.D., Hutson R.A., Lawson P.A., Falsen E., Duerden B.I. *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **53**, 1065–1068 (2003)
18. Hernandéz J.S., Persi B.M., Guirao G.Y., Zufiaurre N.G., Bellido J.L.M., Hernandéz M.S., Rodriguez J.A.G.: In vitro of newer antibiotics against *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium amycolatum* and *Corynebacterium urealyticum. J. Antimicrob. Agents*. **1**, 492–496 (2003)
19. Holmes N.A., Korman T.M. *Corynebacterium kutscheri* infection of skin and soft tissue following rat bite. *J. Clin. Microbiol*. **45**, 3468–3469 (2007)
20. Kazimierczak A.K., Szarapińska-Kwaszewska J.K., Szewczyk E.M.: Opportunistic *Coryneform* organisms-resident of human skin. *Pol. J. Microbiol*. **1**, 27–35 (2005)
21. Lagrou K., Verhaegen J., Janssens M., Wauters G., Verbist L.: Prospective study of catalase-positive Coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. **30**, 7–15 (1998)
22. Larson E.L., McGinley K.J., Leyden J.J. Cooley M.E., Talbot G.H. Skin colonization with antibiotic-resistant (JK group) and antibiotic-sensitive lipophilic diphtheroids in hospitalized and normal adults. *J. Infect. Dis*. **153**, 701–706 (1986)
23. Lee P.P., Ferguson Jr. D.A., Sarubbi F.A. *Corynebacterium striatum*: an underappreciated community and nosocomial pathogen. *J. Infect*. **50**, 338–343 (2005)
24. Martinéz-Martinéz L., Joyanes P., Suărez I., Perea E.I.: Activities of gemifloxacin and five other antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* and coryneform bacteria isolated from clinical samples. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **8**, 2390–2392 (2001)
25. Martinéz-Martinéz L., Ortega M.C., Suărez A.I.: Comparsion of E-test with broth microdilution and disc diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **5**, 1318–1321 (1995)
26. Mikucka A: *Coryneform* bakterie – znane drobnoustroje, nieznane patogeny? *Post. Mirobiol.* **4**, 385–401 (2003)
27. Mikucka A.: Znaczenie *Corynebacterium* sp. w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol*. **4**, 403–418 (2003)
28. Mikucka A.: Oportunistyczne gatunki coryneform w zakażeniach szpitalnych. Praca doktorska. Akademia Medyczna, Bydgoszcz (2001)
29. Mikucka A., Gospodarek E.: Coryneform bakterie – niedoceniony czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych? *Zakażenia*, **6**, 82–85 (2004)
30. Nieto E., Zapardiel J., Rosiano F.: Enviromental contamination by *Corynebacterium urealyticum* in a teaching hospital. *J. Hosp. Infect*. **32**, 78–79 (1996)
31. Olender A.M.: Zakażenia krwi wywoływane przez oportunistyczne gatunki z rodzaju *Corynebacterium. Sepsis*, **1**, 83–85 (2008)
32. Otsuka Y., Kawamura Y., Koyama T., Iihara H., Ohkusu K., Ezaki T.: *Corynebacteriuum resistens* sp. nov., a new multidrug-resistant coryneform bacterium isolated from human infections. *J. Clin. Microbiol*. **43**, 3713–3717 (2005)
33. Otsuka Y., Ohkusu K., Kawamura Y., Baba S., Ezaki T., Kimura S.: Emergence of multidrug-resistant *Cornebcterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2**, 109–114 (2006)
34. Power E.G.M., Abdulla Y.H., Talsania H.G., Spice W., Aathithan S., French G.L. *VanA* genes in vacomycin-resistant clinical isolates of *Oerskovia turbata* and *Arcanobacterium* (*Corynebacterium haemolyticum*). *J. Antimicrob. Chemother*. **36**, 595–606 (1995)
35. Renaud F.N.R., Le Coustumier A., Wilhem N., Aubel D., Riegel P., Bollet C., Freney J.: *Corynebacterium hansenii* sp. nov., an a-glucosidase-negative bacterium related to *Corynebacterium xerosis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **57**, 1113–1116 (2007)
36. Riegel P., Creti R., Mattei R., Nieri A., von Hunolstein C.: Isolation of *Corynebacterium tuscaniae* sp. nov. from blood cultures of a patient with endocarditis. *J. Clin. Microbiol*. **44**, 307–312 (2006)
37. Sekura-Bander D., Dworak-Stelmaska E., Kuklińska D.: Przypadek bakteryjnego zapalenia wsierdzia (bzw) wywołanego przez *Corynebacterium* grupy JK. *Przeg. Epid*. **4**, 396–397 (1995)
38. Shukla S.K., Bernard K.A., Harney M., Frank D.N., Reed K.D.: *Corynebacterium nigricans* sp. nov.: proposed name for a black-pigmented *Corynebacterium* species recovered from the human female urogenital tract. *J. Clin. Microbiol*. **41**, 4353–4358 (2003)
39. Soriano F., Rodriguez-Tudela J.L., Fernández-Roblas R., Aguado J.M., Santamaría M.: Skin colonization by *Corynebacterium*

groups D2 and JK in hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1878–1880 (1988)
40. Soriano F., Zapardiel J., Nieto E.: Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18-antimicrobial agents. *Antimicrob. Ag. Chemother*. **1**, 208–214 (1995)
41. Szarafińska-Kwaszewska J.: Bakterie z grupy Maczugowate (Coryneform). (w) Diagnostyka bakteriologiczna, red. E.M. Szewczyk, PWN, Warszawa, 2005, s. 41–52
42. Tauch A., Pühler A. i wsp.: Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial patogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-reguiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol*. **187**, 4671–4682 (2005) (cytowana opraca jest dziełem 16 autorów)
43. Van den Velde S., Lagrou K., Desmet K., Wauters G., Verhaege J.: Species identification of corynebacteria by cellular fatty acid analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. **54**, 99–104 (2006)
44. Weiss K., Laverdiére M., Rivest R.: Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion methods. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **4**, 930–933 (1996)
45. Williams D.Y., Selepak S.T., Gill V.J.: Identification of clinical isolates of nondiphtherial *Corynebacterium* species and their antibiotic susceptibility patterns. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 17, 23–28 (1993)
46. www.abbiodisk.com – ETEST® APPLICATION SHEET, Fastidious Gram Positive Bacilli
47. Yassin A.F. *Corynebacterium ureicelerivorans* sp. nov., a lipophilic bacterium isolated from blood culture. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **57**, 1200–1203 (2007)
48. Zalas P., Mikucka A., Gospodarek E.: Występowanie *Corynebacterium amycolatum* w materiale klinicznym. *Med. Dośw. Microbiol*. **2**, 139–145 (2004)
49. Zalas P., Mikucka A., Gospodarek E.: Właściwości biochemiczne *Corynebacterium amycolatum*. *Med. Dośw. Mikrobiol*. **56**, 147–154 (2004)
50. Zapardiel J., Nieto E., Gegúndez M.I., Gadea I., Soriano F.: Problems in minimum inhibitory concentration determinations in coryneform organism. Comparison of an agar dilution and the Etest. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. **19**, 171–173 (1994)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 325–330
http://www.pm.microbiology.pl

ZAGROŻENIE LEGIONELOZĄ W SZPITALACH – PROBLEM TECHNICZNY CZY MIKROBIOLOGICZNY?

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Katarzyna Pancer*, Hanna Stypułkowska-Misiurewicz

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. 022 54 21 308
* Autor korespondencyjny: e-mail: kpancer@pzh.gov.pl

1. Wstęp. 2. Legioneloza. 3. Kontrola i redukcja zagrożenia zakażeniami pałeczkami *Legionella* spp. w szpitalu. 4. Podsumowanie

Risk of nosocomial legionellosis – technical or microbiological problem?

Abstract: Legionnaires' disease was first time described in 1976, but in Poland legionellosis, especially nosocomial infection, should be considered an emerging-disease. The number of reported hospital infections is underestimated. Only one outbreak of hospital acquired pneumonia due to *L. pneumophila* was discovered in Poland in 2007. According to the results of our study the majority of examined hospital hot water systems were colonized with *L. pneumophila*, in a number highly exceeding the limit of 100 cfu/100 ml. Some of the strains isolated from the water system expressed virulence markers such as epitope MAb3/1 or toxin RTX. The problem of colonization of hot water systems with *L. pneumophila* should be recognized asthe outcome of technically defective construction and not improper maintenance of water systems in hospitals. For the evaluation of the risk of *L. pneumophila* nosocomial infections, the analysis of technical problems connected with the multiplication of *Legionella* in the water system and equipment of hospitals, i.e. the number of *Legionella* cells in water samples (cfu/100 ml), exposure of people belonging to the high risk group for infection and virulence properties of *L. pneumophila* strains isolated from water systems should be analyzed.

1. Introduction. 2. Legionellosis. 3. Control and reduction of risk of nosocomial *Legionella* infections. 4. Summary

Słowa kluczowe: legioneloza, nowo-pojawiające się choroby, zakażenia szpitalne
Key words: legionellosis, emerging disease, nosocomial infections

1. Wstęp

Legioneloza jest to zachorowanie wywołane przez bakterie należące do rodziny *Legionellaceae.* Bakterie te wraz z należącymi do rodziny *Coxiellaceae* tworzą rząd *Legionellales*. Obecnie trwa dyskusja dotycząca dalszego podziału taksonomicznego w obrębie rodziny *Legionellaceae.* Wielu naukowców uważa, że oprócz rodzaju *Legionella*, należy także wyróżnić rodzaje *Fluoribacter* i *Tatlockia*, obejmujące niektóre gatunki do tej pory zaliczane do rodzaju *Legionella* takie jak *L. bozemanii* (*F. bozemanii*) i *L. micdadei* (*T. micdadei*) [2]. Ze względu na występowanie bakterii *Legionellaceae* w środowisku wodnym, szczególnie tym stworzonym przez człowieka oraz zdolność tych bakterii do namnażania się w temperaturze od 20°C do 50°C, zakażenia pałeczkami *Legionella* spp. uważane są za jedną z chorób cywilizacyjnych.

2. Legioneloza

Legioneloza może manifestować się jako: zapalenie płuc (legionelozowe zapalenie płuc, choroba legionistów, LD) lub zakażenie o umiejscowieniu pozapłucnym często mające grypopodobne objawy (np. gorączka Pontiac). Zakażenia powodują przede wszystkim pałeczki zaliczane do gatunku *L. pneumophila* grupy serologicznej 1 (ok. 50–80% wykrywanych zachorowań) i *L. pneumophila* sg 2–15 (ok. 10–20%). Z zachorowaniami wiązanych jest jednak co najmniej 20 gatunków *Legionella* m.in. *L. micdadei* (*T. micdadei*), *L. bozemanii* (*F. bozemanii*), *L. longbeachae*, *L. feeleii.* Zakażenie następuje poprzez inhalację skażonego tymi bakteriami aerozolu wodno-powietrznego o wielkości kropli 2–5 μm lub aspirację wody. Źródłem zakażenia mogą być wszelkie urządzenia wytwarzające aerozol wodno-powietrzny. Śmiertelność wśród osób, u których stwierdzono chorobę legionistów waha się od 5 do 30% chorych i zależy od ogólnego stanu pacjenta, zjadliwości szczepu *Legionella* spp. wywołującego zachorowanie, czasu narażenia na zakażenie oraz zastosowanego leczenia. Do grupy ryzyka zakażeniami *Legionella* zaliczane są osoby starsze, chorzy poddani leczeniu immunosupresyjnemu, przeciwnowotworowemu, długotrwałej antybiotykoterapii, z przewlekłymi schorzeniami dróg oddechowych lub chorobami metabolicznymi np. cukrzycą, uzależnieni od alkoholu, nikotyny itp. Są to także osoby bez dodatkowych schorzeń, ale pracujące w środowisku, w którym wytwarzany jest aerozol wodno-powietrzny np. obsługujący bicze wodne, wanny wirowe itp. w sanatorium, myjnię samochodów, myjnię warzyw oraz osoby korzystające z wanien wirowych, masaży wodnych, nawilżaczy itp. Czynnikiem ryzyka jest też przepracowanie i zestresowanie oraz częste

podróże, a czasem przebywanie w zasięgu klimatyzatora i jego wieży chłodniczej [26].

Ze względu na miejsce zakażenia zachorowania wywołane przez *Legionella* spp. podzielono na pozaszpitalne (*community acquired pneumonia*), nabyte w szpitalu (*hospital-acquired pneumonia* – HAP) oraz podczas podróży. Zgodnie z danymi European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) w latach 1993–2006 zgłoszono w krajach członkowskich EWGLI (obecnie 35 krajów) ogółem 41627 zachorowań na LD, w tym w latach 2005–2006 – 11 980. Spośród 11980 chorych na legionelozę w latach 2005–2006 zmarło 377 osób (6,6%), a zachorowania pozaszpitalne stanowiły 58,8%. Zachorowania wiązane z podróżami stwierdzono w 21,8% przypadkach, w tym podróży zagranicznej w 11,6%. Zgłoszono 629 (5,3%) przypadki legionelozowego zapalenia płuc nabytego podczas hospitalizacji. Ogółem w tych latach stwierdzono 214 ognisk legionelozy (1028 zachorowań) w tym 66,8% stanowiły zachorowania wiązane z podróżami [18].

Odsetek zakażeń szpitalnych wywoływanych przez pałeczki *Legionella* spp. systematycznie maleje z 7,6% w roku 2003 do 4,9% w roku 2006, ale liczba wykrywanych zakażeń pozostaje na podobnym poziomie (tab. I) [18, 19].

Tabela I

Szpitalne legionelozowe zapalenia płuc (HAP-L) zgłoszone w latach 2003–2006 w Europie wg danych EWGLI [18, 19]

Rok	Liczba wykrytych zachorowań na chorobę legionistów ogółem w Europie (EWGLI)	Liczba HAP-L (%)
2003	4578	343 (7,6)
2004	4588	308 (6,7)
2005	5700	322 (5,6)
2006	6280	307 (4,9)

W Polsce legioneloza podlega rejestracji od 1.01. 2002 roku (Dz.U.2001, Nr 126, poz. 1384). W roku 2003 zgłoszono w Polsce 3 zachorowania na legionelozę, w 2004 r. – 8, w 2005 r. – 21, w 2006 r. – 89, natomiast w 2007 r. – 28 [22]. Liczby zgłoszonych zachorowań nie obrazują sytuacji epidemiologicznej w Polsce. Wzrost liczby zachorowań w roku 2006 należy wiązać z prowadzonymi przez nas badaniami naukowymi i współpracy z kilkoma wybranymi ośrodkami w województwie mazowieckim. W 2006 roku aż 76 spośród 89 zachorowań zgłoszonych zostało w województwie mazowieckim. Z tego powodu dostępne dane epidemiologiczne nt. legionelozy w Polsce należy uznać **za znacznie zaniżone oraz niereprezentatywne dla całego kraju**, będące jedynie obrazem stopnia zainteresowania diagnostyką legionelozy**.** Można więc uznać zakażenia pałeczkami *Legionella* spp. za nowo ujawniane zagrożenia dla zdrowia publicznego, także w Polsce.

W Polsce opisano do tej pory 1 ognisko szpitalnego legionelozowego zapalenia płuc, które wykryto w grudniu 2006 roku. Zachorowały 4 osoby, 3 z nich zmarły (śmiertelność 75%). U dwojga zmarłych pacjentów diagnozę postawiono już po ich śmierci, 3 chora zmarła po kilku tygodniach na skutek zmian ogólnoustrojowych [21]. W szpitalu tym nie prowadzono diagnostyki legionelozy, ale 2 gwałtowne zgony w wyniku zapalenia płuc u chorych hospitalizowanych na oddziale okulistycznym zwróciły uwagę lekarzy oraz zespołu ds. zakażeń szpitalnych.

Tak znikomy stan wiedzy nt. legionelozy szpitalnej w Polsce jest wynikiem nie tylko braku prowadzonych badań diagnostycznych w kierunku legionelozy. Testy komercyjne oferują prawie wyłącznie wykrywanie zakażeń wywołanych przez pałeczki *L. pneumophila* sg 1. Natomiast istnieje zróżnicowanie geograficzne pod względem częstości zachorowań wywoływanych przez poszczególne odmiany pałeczek *Legionella* spp. H e l b i g i wsp. [11] wykazali, że wśród czynników powodujących szpitalne legionelozowe zapalenie płuc w krajach basenu Morza Śródziemnego dominują pałeczki *L. pneumophila* sg 1 (76,6%). Natomiast legionelozowe zapalenie płuc nabyte podczas hospitalizacji w krajach skandynawskich wywołane było przede wszystkim (71,2%) przez bakterie *L. pneumophila* sg 2–15 i inne gatunki *Legionella* spp. Tak więc zastosowanie testów ukierunkowanych na *L. pneumophila* sg 1 może uniemożliwić wykrycie zakażenia wywołanego przez bakterie *Legionella* inne niż *L. pneumophila* sg 1. Wybrane przykłady czynników legionelozowego szpitalnego zapalenia płuc przedstawiono tabeli II.

Zgodnie z Rozporządzeniem MZ w sprawie rejestrów zakażeń zakładowych (Dz.U. 2005, Nr 54, poz. 484) pałeczki *Legionella pneumophila* są zaliczane do drobnoustrojów alarmowych. W każdym przypadku stwierdzenia zakażenia wywołanego przez pałeczki *Legionella* należy sprawdzić okres hospitalizacji chorego. Jeśli czas hospitalizacji do wystąpienia pierwszych objawów był dłuższy niż 2 dni wówczas należy rozważyć możliwość wystąpienia zakażenia szpitalnego. Zgodnie z naszą wiedzą sporadyczne zachorowania na legionelozę nabytą w szpitalu stwierdzono także w kilku szpitalach w Polsce, jednak dane te nie zostały opublikowane.

3. Kontrola i redukcja zagrożenia zakażeniami pałeczkami *Legionella* spp. w szpitalu

Analiza danych z Polski i z innych krajów wskazuje, że zakażenia szpitalne wywołane przez pałeczki *Legionella* spp. w Polsce są nowo-rozpoznanym problemem, który będzie narastał. Problem ten nie ogranicza się do szpitali/oddziałów, na których przeprowa-

Tabela II

Wybrane zachorowania na legionelozowe zapalenie płuc nabyte podczas hospitalizacji

Kraj (miasto/stan)	Rok	Czynnik etiologiczny	Liczba chorych	Liczba (%) zgonów	Piśmiennictwo
USA (Pitsburg)	1987–96	*L.pneumophila* (Lp) różne sg	25	13 (52%)	[14]
Szwecja	1993	Lp sg 4, 10	8	0	[3]
USA (Delaware)	1994	Lp sg 1	29	0	[6]
Hiszpania (Barcelona)	1994–98	Lp sg 6	5	0	[7]
USA (Pitsburg)	1995	Lp sg 5	3	0	[8]
USA (Pitsburg)	1996–97	Lp sg 1, 3, 5	12	0	[10]
USA (Pitsburg)	1999	Lp sg 1	6	0	[20]
Japonia (Nagoja)	2000	Lp sg 10	1	1 (100%)	[23]
Izrael	2000	Lp sg 3	4	1 (25%)	[17]
Szwecja (Sztokholm)	2004	Lp sg 6	3	0	[9]
Włochy (Rzym)	2004	Lp sg 1	1	0	[5]
Polska	2006	Lp sg 1	4	3 (75%)	[21]

dzane są wysoce specjalistyczne procedury medyczne np. transplantacje, leczenie przeciwnowotworowe itp. [4]. Chorzy, hospitalizowani na innych oddziałach są także narażeni na zakażenie bakteriami *Legionella.*

Podstawowym czynnikiem powodującym zagrożenie jest przede wszystkim zasiedlenie przez bakterie *Legionella* spp. systemu wodnego szpitala lub poszczególnych urządzeń wytwarzających aerozol wodno-powietrzny. Na świecie przeprowadzono szereg badań mających na celu określenie częstości zasiedlenia systemów wodnych w szpitalach przez pałeczki *Legionella* (tab. III). W naszych badaniach stwierdzili-

Tabela III

Przykładowe wyniki badania częstości występowania kolonizacji systemów wodnych szpitali przez pałeczki *Legionella* sp. [10, 13, 16, 25]

Kraj	Liczba badanych szpitali	% szpitali zasiedlonych przez pałeczki *Legionella*
Wielka Brytania	40 69 17	70 55 12
Kanada	84	68
USA	12 6	91 83
Polska – badania własne	8	100

śmy obecność pałeczek *L. pneumophila* w systemach wodnych wszystkich 8 badanych szpitali.

Warunkami niezbędnymi do namnażania się pałeczek *Legionella* spp. są: dogodne warunki do powstania biofilmu czyli stagnacja wody, dostęp substancji odżywczych i temperatura w zakresie 20–45ºC. Kolonizacja przez pałeczki *Legionella* spp. systemu wodnego, przede wszystkim sieci wody ciepłej, jest wynikiem szeregu czynników m.in. błędnego zaprojektowania tego systemu, wprowadzanych licznych zmian w trakcie eksploatacji, zastosowania nieodpowiednich materiałów oraz niewłaściwego utrzymywania systemu wodnego [26].

Najważniejsze i podstawowe elementy niezbędne do spełnienia to:

1. ograniczenie powstawania biofilmu przez brak stagnacji wody (wymuszona cyrkulacja wody ciepłej i zimnej; brak martwych końców i ślepych odnóg; ograniczenie do niezbędnego minimum liczby wylewek itp., unikanie bardzo długich połączeń) oraz unikanie stratyfikacji (powstawania warstw wody zimniejszej i cieplejszej) w zbiorniku wody zimnej i podgrzewaczu; stosowanie odpowiednich materiałów, z których wykonane są zbiorniki, rury itp. (np. nie powinno stosować się w szpitalu tzw. giętkich połączeń);
2. utrzymywanie temperatury wody ciepłej powyżej 55°C na najdalszych wylewkach, a zimnej poniżej 20°C , zamontowanie odpowiedniego pogrzewacza wody, izolacja przewodów odpowiednio oznakowanych; wykonanie przewodów z odpowiednich materiałów umożliwiających dezynfekcję termiczną;
3. ograniczenie substancji odżywczych: system wodny (rury, zbiorniki, krany, prysznice itp.) powinien być bez korozji, osadów, biofilmu, śluzu itp.. Wszelkie wylewki (np. sitka pryszniców) powinny być regularnie czyszczone, a te rzadziej używane niż 1 raz w tygodniu – przepłukiwane.

Aby zapewnić kontrolę nad skażeniami systemu wodnego przez *Legionella* konieczne jest wprowadzenie procedur czyszczenia, dezynfekcji systemu oraz monitorowania parametrów fizycznych i chemicznych wody. Istnieje wiele różnych metod dezynfekcji, które muszą być odpowiednio dobrane do wielkości i właściwości danej sieci wodnej.

Można wyróżnić dezynfekcję w trybie alarmowym oraz wdrożenie procedur regularnej/stałej dezynfekcji.

Do metod stosowanych w trybie alarmowym zalicza się m.in.:

- szok termiczny – jest to dezynfekcja wodą podgrzaną do temperatury co najmniej 70°C (temperatura mierzona w najdalej wysuniętym wypływie) przez czas określony pojemnością i długością sieci wodnej;
- szok chemiczny – dezynfekcja z zastosowaniem najczęściej związków chloru w stężeniu 50 mg/l przez czas 1–2 godziny (w zależności od wielkości tego systemu wodnego). Po takiej dezynfekcji należy sieć wodną przepłukać i doprowadzić do dozwolonego stężenia jonów chloru w wodzie pitnej;
- filtry – mechaniczne zatrzymywanie drobnoustrojów na membranie (filtry na wylewce).

Wśród metod stosowanych do stałej dezynfekcji najczęściej stosowane są:

- „reżim temperaturowy" tj. stałe utrzymywanie w sieci temperatury wody zimnej poniżej 20°C, oraz wody ciepłej powyżej 55°C;
- stała dezynfekcja chemiczna – stałe dozowanie środka dezynfekcyjnego i monitorowanie jego stężenia. Najczęściej stosowane są związku chloru i bromu;
- promieniowanie UV;
- jonizacja (jony srebra i miedzi) i inne [26].

Każda metoda dezynfekcji ma swoje ograniczenia, nie tylko związane z kosztami. Zastosowanie jednorazowe jedynie szoku termicznego może doprowadzić do znacznego wzrostu liczby *Legionella* spp. w wodzie. Wysoka temperatura wody spowoduje obumarcie powierzchniowych warstw biofilmu, ale bakterie znajdujące się głębiej przeżyją i ponownie namnożą mając do wykorzystania bogate źródło materiałów odżywczych (zabite bakterie, pierwotniaki). Bakterie występujące w biofilmie są także chronione przed działaniem chemicznych środków dezynfekujących. Z tego względu procedury alarmowej dezynfekcji powinny uwzględniać wielokrotne przeprowadzenie tego procesu lub zastosowanie kilku metod (np. szoku termicznego i chemicznego) [26].

Wybór metody dezynfekcji i wprowadzenie jej do rutynowej procedury również nastręcza wiele problemów. Wiele zależy także od właściwości wody. Im wyższa temperatura wody i pH tym mniej aktywnego chloru w wodzie. Wartość pH ma również istotny wpływ na skuteczność dezynfekcji metodą jonizacji (Cu-Ag) [15]. Stosowanie promieniowania UV jest skuteczne jedynie wobec bakterii w bardzo czystej wodzie. Wszelkie zanieczyszczenia bardzo zmniejszają bakteriobójcze działanie. Natomiast zastosowanie filtrów w systemie, w którym jest bardzo wiele osadów lub biofilmu może spowodować konieczność szybszej wymiany tych filtrów.

Często, ze względu na koszty, warunki fizyczne i chemiczne wody oraz możliwości techniczne, stosuje się kompilację kilku metod np: utrzymywanie temperatury wody ciepłej powyżej 55°C oraz chlorowanie wody zimnej.

Niestety, całkowita eliminacja pałeczek *Legionella* spp. jest bardzo trudna. Dlatego celem wielu procedur jest redukcja liczby tych bakterii do poziomu uznawanego za bezpieczny. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29.03.2007 (Dz.U. 2007 nr 61, poz. 417) w sprawie wymagań mikrobiologicznych, jakim powinna odpowiadać ciepła woda do spożycia przez ludzi, określa dozwolony limit w szpitalach: 100 jtk *Legionella* spp./ 100 ml wody oraz 0 jtk *Legionella* spp./100 ml w oddziałach gdzie hospitalizowani są pacjenci w immunosupresji. Na mocy tego rozporządzenia od 1.01.2008 wykonywane są mikrobiologiczne badania próbek wody w szpitalach, również w kierunku *Legionella.*

Wydaje się, że problem zagrożenia zakażeniami pałeczkami *Legionella* spp. jest wyłącznie zagadnieniem technicznym. Jednak wyznaczenie bezpiecznego poziomu dla skażenia pałeczkami *Legionella* spp. wody w sieci wodnej szpitali budzi wiele wątpliwości. Na świecie prowadzone są badania mające na celu określenie stopnia narażenia w zależności od wielkości dawki zakaźnej [1].

Bakterie zaliczane do rodzaju *Legionella* różnią się bardzo pod względem właściwości wirulentnych. Obecnie prowadzone są w wielu ośrodkach badania nad tymi właściwościami. Jednym z elementów zjadliwości jest struktura antygenowa, która u bakterii *L. pneumophila* sg 1 nie jest jednolita. W obrębie tej grupy serologicznej wyznaczono podgrupy, z których część zawiera epitop MAb 3/1 wiązany ze zjadliwością. Są to podgrupy: Benidorm, Philadelphia, Knoxville, France/Allentown. Zdolność *Legionella* do wnikania do komórek ludzkich jest wynikiem np. obecności pili typu IV, białka szoku termicznego Hsp60, białka Mip (macrophage infectivity potentiator), cytolitycznego działania toksyny RTX. Zdolność do namnażania się wewnątrz komórek ludzkich jest uwarunkowana przez wiele różnych czynników m.in system transportu typu IV (*icm*/*dot*), system transportu typu II (*lvh*, *pil*D), pozyskiwanie jonów żelaza (*feo*B, *ira*A, *ccm*C), czynniki regulatorowe np. RpoS i inne [12].

Analizując wyniki badań naszego zespołu (tab. IV) stwierdzono, że żaden spośród badanych szpitali nie spełnia wymogów w świetle Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 29.03.2007. Systemy wodne we wszystkich badanych szpitalach były skolonizowane przez *L. pneumophila* (wysoki odsetek prób dodatnich) w liczbie znacznie przekraczającej dozwolony limit. W szpitalu E, uznany za bezpieczny limit został prze-

Tabela IV

Oznaczone liczby *L. pneumophila* w próbkach wody oraz wybrane spośród analizowanych właściwości szczepów (badania własne)

Szpital	Najniższa liczba *Legionella* jtk/100 ml wody	Najwyższa liczba *Legionella* jtk/100ml wody	% prób *Legionella* – dodatnich	Szczepy Lp sg 1 (% badanych)	Epitop Mab 3/1	RTX (%)
A	320	19 000	100	18	0	7
B	950	13 000	100	0	0	0
C	290	13 000	100	0	0	0
D	19	3 000	100	0	0	0
E	1 100*	150 000	87,5	9	0	7
F	2*	580	83,3	71	0	9
G	21	4 700	100	82	tak	64
H	69*	8 800	90	18	tak	14,3

* najniższa oznaczona liczba pałeczek *Legionella* w próbkach dodatnich

kroczony nawet 1500-krotnie, a 100% próbek wody ciepłej było dodatnich. Jedynie w próbkach wody zimnej nie stwierdzono obecności pałeczek *Legionella* spp. Niestety, nie mieliśmy możliwości badania próbek pobranych od chorych z zapaleniem płuc hospitalizowanych w szpitalu E.

W naszych badaniach wykazano silny związek między wystąpieniem zachorowania na legionelozę a zdolnością bakterii do wytwarzania toksyny RTX oraz obecnością epitopu MAb 3/1 ($p<0,05$). Nie stwierdzono tak silnej zależności w analizie obecności genu *pil*D oraz *icm*X w genomie pałeczek *L. pneumophila*. Większość szczepów *L. pneumophila* RTX(+) należała do grupy serologicznej 1. Należy jednak pamiętać, że toksynę tę mogą wytwarzać nie tylko bakterie *L. pneumophila* sg 1, ale także należące do innych serogroup (w naszych badaniach były to szczepy określone jako należące do serogrupy 2, 3, 6).

Szczególnie istotne było stwierdzenie, że zgony w wyniku zakażenia pałeczkami *L. pneumophila* stwierdzono w szpitalu G, w którym maksymalna liczba *Legionella* w próbce wody (rzędu 1000 jtk/100 ml) była niższa niż w innych badanych szpitalach, choć przekraczała dozwolony limit. Natomiast najniższa oznaczona liczba tych bakterii mieściła się tzw. bezpiecznym limicie. Należy zwrócić uwagę, że aż 82% badanych bakterii należało do *L. pneumophila* sg 1, podgrupy Benidorm (MAb3/1(+)) i aż 64% spośród badanych szczepów wykazywało obecność genu kodującego toksynę RTX.

4. Podsumowanie

Na podstawie naszych wyników oraz danych z piśmiennictwa postawiono tezę, że pełna ocena zagrożenia legionelozą powinna obejmować analizę danych czy w budynku:

1. występują urządzenia wytwarzające aerozol wodno-powietrzny o odpowiedniej wielkości kropli,
2. występują odpowiednie warunki do namnażania się pałeczek *Legionella* (temperatura, źródło substancji odżywczych),
3. stwierdzono obecność pałeczek *Legionella* w próbkach pobranych z tych urządzeń i sieci wodnych,
4. czy narażeni byli ludzie, a jeśli tak czy należą oni do grup podwyższonego ryzyka,
5. czy izolowane szczepy *L. pneumophila* posiadają właściwości wskazujące na podwyższony potencjał chorobotwórczy.

Piśmiennictwo

1. Armstrong T.W., Haas C.N.: Quantitative microbial risk assessment model for Legionnaires' disease: assessment of human exposures for selected spa outbreaks. *J. Occup. Environ. Hyg.* **4**, 634–646 (2007)
2. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T.: The Gammaproteobacteria, Vol. 2 (w:) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, red. G.M.Garrity, Springer, USA, 2005
3. Bernander S., Jacobson K., Lundholm M.: A hospital-associated outbreak of Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroups 4 and 10 with a common genetic fingerprinting pattern. *APMIS*, **112**, 210–217 (2004)
4. Blatt S.P., Parkinson M.D., Pace E., Hoffman P., Dolan D., Lauderdale P., Zajac R.A., Melcher G.P.: Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Am. J. Med.* **95**, 16–22 (1993)
5. Boccia S., Ricciardi G. i wsp.: Prospective 3-year surveillance for nosocomial and environmental *Legionella pneumophila*: implications for infection control. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**, 459–465 (2006) (cytowana praca jest dziełem 14 autorów)
6. Brown C.M., Nuorti P.J., Breiman R.F., Hathcock A..L, Fields B.S., Lipman H.B., Llewellyn G.C., Hofmann J., Cetron M.: A community outbreak of Legionnaires' disease linked to hospital cooling towers: an epidemiological method to calculate dose of exposure. *Int. J. Epidemiol.* **28**, 353–359 (1999)

7. Campins M., Ferrer A., Callís L., Pelaz C., Cortés P.J., Pinart N., Vaqué J.: Nosocomial Legionnaire's disease in a children's hospital. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **19**, 228–234 (2000)
8. Chang F.Y., Jacobs S.L., Colodny S.M., Stout J.E., Yu V.L.: Nosocomial Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 5: laboratory and epidemiologic implications. *J. Infect. Dis.* **174**, 1116–1119 (1996)
9. Fendukly F., Bernander S., Hanson H.S.: Nosocomial Legionnaires' disease caused by Legionella pneumophila serogroup 6: implication of the sequence-based typing method (SBT). *Scand. J. Infect. Dis.* **39**, 213–216 (2007)
10. Goetz A.M., Stout J.E., Jacobs S.L., Fisher M.A., Ponzer R.E., Drenning S., Yu V.L.: Nosocomial legionnaires' disease discovered in community hospitals following cultures of the water system: seek and ye shall find. *Am. J. Infect. Control*, **26**, 8–11 (1998)
11. Helbig J.H., Harrison T.G. i wsp.: Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 710–716 (2002) (cytowana praca jest dziełem 15 autorów)
12. Huang B., Yuan Z., Heron B.A., Gray B.R., Eglezos S., Bates J.R., Savill J.: Distribution of 19 major virulence genes in *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and water in Queensland, Australia, *J. Med. Microbiol.* **55**, 993–997 (2006)
13. Kool J.L., Bergmire-Sweat D., Butler J.C., Brown E.W., Peabody D.J., Massi D.S., Carpenter J.C., Pruckler J.M., Benson R.F., Fields B.S.: Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **20**, 798–805 (1999)
14. Kool J.L., Breiman R.F. i wsp.: More than 10 years of unrecognized nosocomial transmission of legionnaires' disease among transplant patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**, 898–904 (1998) (6a) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
15. Lin Y.S., Vidic R.D., Stout J.E., Yu V.L.: Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila. Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2711–2715 (2002)
16. Marrie T.J., De Carolis E., Yu V.L., Stout J.: Canadian Community-Acquired Pneumonia Investigators. Legionnaires' disease – Results of a multicentre Canadian study. *Can. J. Infect. Dis.* **14**, 154–158 (2003)
17. Oren I., Zuckerman T., Avivi I., Finkelstein R., Yigla M., Rowe J.M.: Nosocomial outbreak of *Legionella pneumophila* serogroup 3 pneumonia in a new bone marrow transplant unit: evaluation, treatment and control. *Bone Marrow Transplant.* **30**, 175–179 (2002)
18. Ricketts K.D., Joseph C.A.: Legionnaires' disease in Europe: 2005–2006 Eurosurveill, **12** (2007)
19. Ricketts K.D., Joseph C.: Legionnaires' disease in Europe: 2003–2004 EuroSurveill, **10** (2005)
20. Stout J.E., Brennen C., Muder R.R.: Legionnaires' disease in a newly constructed long-term care facility. *J. Am. Geriatr. Soc.* 48, 1589–1592 (2000)
21. Stypułkowska-Misiurewicz H., Pancer K., Krogulska B., Matuszewska R.: Ognisko choroby legionistów na oddziale okulistycznym. Szpitalne zakażenie *Legionella pneumophila* po raz pierwszy obserwowane w Polsce. *Przeg. Epid.* **61**, 657–665 (2007)
22. Stypułkowska-Misiurewicz H., Pancer K.: Legioneloza w Polsce w 2005 roku. *Przeg. Epid.* **61**, 235–238 (2007)
23. Torii K., Iinuma Y., Ichikawa M., Kato K., Koide M., Baba H., Suzuki R., Ohta M.: A case of nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia. *Jpn. J. Infect. Dis.* **56**, 101–102 (2003)
24. Wong S., Pabbaraju K., Burk V.F., Broukhanski G.C., Fox J., Louie T., Mah M.W., Bernard K., Tilley P.A.: Use of sequence-based typing for investigation of a case of nosocomial legionellosis. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1707–1710 (2006)
25. Yu V.L.: Nosocomial legionellosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **13**, 385–388 (2000)
26. http://www.ewgli.org/data/european_guidelines.htm (23.04. 2008)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 331–338
http://www.pm.microbiology.pl

ZAKAŻENIA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* – AKTUALNE PROBLEMY

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Monika Nowosiad, Stefania Giedrys-Kalemba*

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie,
ul. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, tel. (91) 466 16 52
* Autor korespondencyjny: e-mail: kalemba@mp.pl

1. Wprowadzenie. 2. Czynniki wirulencji. 3. Chorobotwórczość. 4. Epidemiologia zakażeń *S. pneumoniae.* 5. Oporność na antybiotyki. 6. Profilaktyka 7. Podsumowanie

***Streptococcus pneumoniae* infections – current issues**

Abstract: S. *pneumoniae* is not only the main ambulatory bacterial pathogen of respiratory tract, sometimes serious invasive disease, but can also colonize the nasopharynx asymptomatically. These bacteria produce many virulence factors which help them escape immune defenses and spread in the human body. Pneumococci show exceptional recombination ability in response to human interference in their biology. Gene polymorphism is responsible for the ease of phenotypic evolution which leads to serotype diversity, rapid increase of antimicrobial resistance and clonal spread of multiresistant strains. The resistance of *S. pneumoniae* population presents a great geographical diversity dependent on the local antimicrobial policy and needs continuous, multicenter monitoring as well as a new and more effective strategy of antipneumococcal defense. Vaccine prophylaxis is the only effective alternative, so far.

1. Introduction. 2. Virulence factors. 3. Pathogenicity. 4. Epidemiology of *S. pneumoniae* infections. 5. Antibiotic resistance. 6. Prophylaxy 7. Summary

Słowa kluczowe: zakażenia *Streptococcus pneumoniae,* oporność, profilaktyka
Key words: *Streptococcus pneumoniae* infections, resistance, prophylaxis

1. Wprowadzenie

Streptococcus pneumoniae w polskim mianownictwie jest znany jako pneumokok lub dwoinka zapalenia płuc. Należy do rodzaju *Streptococcus*, do grupy *S. mitis*. Bakterie te zostały wyizolowane w 1880 roku niezależnie przez Sternberga i Pasteura, a w roku 1886 uznane przez Weichselbauma za przyczynę płatowego zapalenia płuc, co odzwierciedla ich stara nazwa – *Diplococcus pneumoniae* [5].

Pneumokoki należą do istotnych klinicznie ludzkich patogenów. Posiadają szeroki wachlarz czynników zjadliwości. Wywołują nie tylko ciężkie zakażenia inwazyjne, ale również większość bakteryjnych zakażeń układu oddechowego, stanowiących najczęstszy powód wizyt chorych wszystkich grup wiekowych u lekarzy rodzinnych. Zakażenia inwazyjne, związane z penetracją łożyska krwi są jedną z głównych przyczyn znacznej zachorowalności i śmiertelności, niezależnie od regionu świata [20]. Zakażeniom sprzyja nosicielstwo pneumokoków w nosogardle, szczególnie wysokie u małych dzieci [39]. W ostatnich latach leczenie zakażeń pneumokokowych wiąże się z coraz większą liczbą niepowodzeń klinicznych. Ma to związek z narastaniem oporności na różne grupy chemioterapeutyków, zmiennością antygenową oraz łatwością klonalnego rozprzestrzeniania się wieloopornych szczepów w środowisku [37]. Jest to naturalna odpowiedź mikroorganizmów na próby ich zwalczania.

2. Czynniki wirulencji

S. pneumoniae wytwarza szereg struktur powierzchniowych i enzymów, ułatwiających adhezję do komórek nabłonkowych, następnie inwazję tkanek i łożyska naczyniowego, wywoływanie zmian patologicznych oraz obronę przed układem odpornościowym człowieka. Do najważniejszych czynników wirulencji należą: otoczka, pneumolizyna, adhezyna, białko Psp A, proteaza IgA, neuraminidaza, hialuronidaza oraz autolizyna [8, 34].

Najwięcej uwagi poświęcono wielocukrowej otoczce. Otoczka utrudnia opsonizację komórek poprzez składnik C3b dopełniacza oraz przeciwciała przeciw zawartym w ścianie kwasom teichojowym, przez co zmniejsza zdolność fagocytarną leukocytów. Podczas inwazji, powierzchnia szczepów otoczkowych jest wielokrotnie bardziej wirulentna niż bezotoczkowych. Znaczna zmienność antygenowa otoczki stała się podstawą podziału pneumokoków na 90 typów serologicznych. Określanie typu serologicznego polisacharydowej otoczki opiera się na zdolności wiązania ze specyficznymi przeciwciałami powodującymi pęcznienie otoczek. Polisacharydowa otoczka, jako antygen T-niezależny, jest gorzej rozpoznawana przez układ odpornościowy. Nie pobudza limfocytów T, co powoduje brak rozwoju trwałej pamięci immunologicznej i spowolnienie eliminacji patogenu. Powstające w wyniku zakażenia przeciwciała mają słabe właściwości

bakteriobójcze i opsonizujące wobec żywych drobnoustrojów, nie zapewniają także trwałej ochrony przed kolejnym zakażeniem [3].

Autolizyna (LytA, B, C), odpowiedzialna jest za autolizę pneumokoków w stacjonarnej fazie wzrostu, przez co kolonia bakteryjna staje się bardziej płaska, a następnie zapadnięta w środku. W obecności antybiotyków ułatwia uwolnienie składników ściany komórkowej i innych aktywnych biologicznie substancji nasilających stan zapalny i efekt cytotoksyczny, wśród których najbardziej znaczące są pneumolizyna i nadtlenek wodoru [53].

Hemolizyna pneumokokowa wiąże się bezpośrednio z cholesterolem błon komórkowych powodując ich lizę, stymuluje produkcję cytokin pozapalnych (Il-1, Il-6, TNF), aktywuje dopełniacz, hamuje funkcję neutrofili i proliferację limfocytów. Prozapalne cytokiny mogą prowadzić nawet do wstrząsu septycznego.

Wiązanie pneumokoka z komórką zachodzi również poprzez ligandy fosforylocholinowe, które łączą się z receptorem dla czynnika aktywującego płytki (PAF) na komórce nabłonkowej, a także dzięki białkom powierzchniowym (PsaA, Pbc, SpsA, CbpA).

Neuraminidaza, hialuronidaza, a także pneumolizyna ułatwiają rozprzestrzenianie się i inwazję tkanek [8, 34].

Patogenności gatunku *S. pneumoniae* sprzyja naturalny system transformacji genetycznej i szczególna łatwość włączania do swego genomu fragmentów DNA pochodzących od innych ulegających lizie komórek tego samego, a nawet pokrewnych gatunków [16]. Dochodzi wówczas do nabywania nowych genów oraz modyfikacji już posiadanych, co sprawia, że kodowane przez nie białka wykazują budowę mozaikową. Polimorfizm dotyczy głównych czynników zjadliwości, do których należą: otoczka wielocukrowa (geny *cps*), pneumolizyna (gen *ply*), autolizyny (*lyt*A), neuraminidazy (*nan*A i *nan*B), hialuronidaza (*hyl*), powierzchniowe białko A (*psp*A). Transformacja genetyczna, a następnie rekombinacje mogą także ułatwiać narastanie oporności na antybiotyki, w tym penicylinę, niezależnie od wielostopniowych mutacji w genach *pbp* [41].

3. Chorobotwórczość

S. pneumoniae jest najważniejszą przyczyną chorób u małych dzieci, u osób w podeszłym wieku i pacjentów ze współistniejącymi schorzeniami upośledzającymi odporność. Odpowiedzialny jest głównie za zakażenia pozaszpitalne – 30–70%, jako najczęstszy bakteryjny czynnik etiologiczny zakażeń dróg oddechowych. Wywołuje wiele niebezpiecznych zakażeń inwazyjnych, które często przebiegają z bakteriemią (30% przypadków zapaleń płuc), mogą prowadzić do posocznicy, ciężkich powikłań oraz zgonów. *S. pneumoniae* jest najczęstszą (25–35%) przyczyną pozaszpitalnego, płatowego i odoskrzelowego zapalenia płuc i opłucnej oraz jednym z trzech głównych patogenów wywołujących zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Jest głównym czynnikiem etiologicznym zapaleń ucha środkowego (30–50%) oraz zatok (30–40%). To także druga, co do częstości, przyczyna bakteryjnych powikłań grypy oraz zaostrzeń w przewlekłym zapaleniu oskrzeli. Rzadziej pneumokoki wywołują ropne zapalenia spojówek, stawów i kości, otrzewnej i wsierdzia [5, 44].

Według danych Centrum Kontroli Zakażeń (CDC) pneumokoki są odpowiedzialne za więcej przypadków śmierci na świecie, niż jakikolwiek inny patogen. Wśród dorosłych najwyższa umieralność dotyczy zapalenia płuc, u dzieci poniżej 2 roku życia zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i bakteriemii. Wzrost populacji osób z grup ryzyka zakażeń pneumokokowych jest wynikiem starzenia się społeczeństw oraz coraz bardziej skutecznego leczenia osób przewlekle chorych i zwiększenia się przeżywalności pacjentów ze skrajnych grup wiekowych (wcześniaki, >80 lat). Rocznie na całym świecie umiera na zapalenie płuc około 3 miliony dzieci poniżej 5 roku życia, z czego 1 milion zgonów powodują pneumokoki [23].

W Polsce rocznie może występować około 100 000 przypadków pneumokokowego zapalenia płuc, co przy śmiertelności 5–10% jest przyczyną zgonu około 5 000–10 000 osób (dokładnych danych nie ma). Wśród dzieci poniżej 5 roku życia hospitalizowanych w 5 województwach naszego kraju w latach 2003–2004 inwazyjna choroba pneumokokowa występowała u 17,6 na 100 000, z czego zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych dotyczyło 29 z 134 dzieci [25]. Według danych opracowanych przez Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Bakteryjnych Zapaleń Ośrodkowego Układu Nerwowego w Polsce w latach 1997–2002 *S. pneumoniae* był odpowiedzialny za 23% ropnych zakażeń opon mózgowo-rdzeniowych [52]. Z kolei z badań przeprowadzonych w latach 1999–2002 w Centrum Zdrowia Dziecka" pneumokoki były odpowiedzialne za 40% zapaleń zatok, 44% zapaleń ucha, 61% zapaleń płuc i 34% innych schorzeń dróg oddechowych [51].

4. Epidemiologia zakażeń *S. pneumoniae*

S. pneumoniae jest szeroko rozprzestrzenionym patogenem bakteryjnym, który nie tylko wywołuje zakażenia, w tym inwazyjne, ale również bezobjawowo kolonizuje drogi oddechowe. Bytuje głównie w jamie nosowo-gardłowej lub ustno-gardłowej osób zdrowych

w formie tzw. nosicielstwa. Kolonizacja utrzymuje się tygodniami (od 1 do 17 miesięcy), najczęściej ustępuje samoistnie [22]. Może dotyczyć szczepów o różnych serotypach jednocześnie, a ich zmiana występuje co kilka tygodni, rzadziej w zimie i w przypadku serotypów mniej immunizujących jak 6A, 6B, 14 [22, 47]. Analiza genetyczna pneumokoków izolowanych z nosogardzieli dzieci przez pierwsze 2 lata życia wykazała, że zmiana serotypów szczepów nosicielskich to głównie wynik wymiany szczepów, a nie rekombinacyjna wymiana serotypu [43].

Nosicielstwo *S. pneumoniae* jest zróżnicowane. Częściej występuje u młodszych dzieci oraz osób w podeszłym wieku, szczególnie pensjonariuszy domów opieki i placówek opiekuńczych, a także u personelu medycznego i osób przebywających z dziećmi. U małych dzieci obejmuje 20–70% populacji, u dorosłych 5–10% [24].

Efektem kolonizacji nosogardzieli są zarówno zakażenia pneumokokowe, jak i rozprzestrzenianie się bakterii drogą kropelkową. Transmisja pneumokoków jest najbardziej nasilona w miesiącach zimowych oraz w dużych zbiorowościach (żłobki, przedszkola, szkoły, domy opieki). Sprzyjają jej bliskie kontakty oraz zwiększenie ilości wydzieliny w drogach oddechowych w czasie ostrych zakażeń wirusowych układu oddechowego. Badania epidemiologiczne szczepów izolowanych z nosogardzieli, jako wspólnego rezerwuaru szczepów infekcyjnych i nosicielskich, mogą być reprezentatywne dla biologii tego gatunku [18].

Zakażenia pneumokokowe w większości przypadków mają charakter endogenny i są wynikiem rozprzestrzeniania się bakterii nie tylko do jałowych miejsc układu oddechowego, ale także do łożyska krwi, a wraz z nią do innych układów organizmu.

Do najważniejszych czynników ryzyka predysponujących do wystąpienia ciężkich zakażeń pneumokokowych należą: skrajne grupy wiekowe (noworodki, dzieci do 3 roku życia, osoby po 65 roku życia), jesienno-zimowa pora roku, infekcje wirusowe, złe warunki bytowe, alkoholizm, anemia, wrodzone i nabyte zaburzenia odporności miejscowej i ogólnej (zakażenie HIV, funkcjonalna lub anatomiczna asplenia, zespół nerczycowy, choroba nowotworowa, przewlekłe schorzenia układu oddechowego, układu krążenia, nerek, cukrzyca). Dodatkowymi czynnikami predysponującymi do nosicielstwa i zakażenia opornym szczepem są przewlekające się infekcje i wcześniejsza, szczególnie długotrwała antybiotykoterapia – ryzyko zwiększa się 2–9-krotnie [45]. Ryzyko zakażenia opornym szczepem *S. pneumoniae* może być związane także z położeniem geograficznym. Oporność koreluje z zużyciem antybiotyków, stąd w krajach o najwyższym zużyciu antybiotyków obserwuje się najwyższe odsetki szczepów opornych [4].

5. Oporność na antybiotyki

Najlepszą aktywność, właściwości bójcze i wysokie bezpieczeństwo w terapii zakażeń pneumokokowych wykazują antybiotyki z grupy β-laktamów. Alternatywą w przypadku nadwrażliwości na leki β-laktamowe są makrolidy. Mniej skutecznymi lekami są tetracykliny, zalecane w niektórych krajach jako profilaktyka zaostrzeń przewlekłej obturacyjnej choroby płuc oraz klindamycyna – w przypadkach przewlekłego zapalenia zatok lub zachłystowego zapalenia płuc. Częstą opcją terapeutyczną, szczególnie w leczeniu dzieci, z nie do końca uzasadnionych względów jest kotrimoksazol. Rzadko stosowany jest chloramfenikol, mimo swej doskonałej penetracji do centralnego układu nerwowego i dobrej aktywności przeciwpneumokokowej oraz rifampicyna. Jedynym do niedawna lekiem, ratującym życie w związku ze swą niemal stuprocentową aktywnością była wankomycyna. Nowymi opcjami terapeutycznymi są oksazolidynony, chinupristyna/dalfopristyna, ketolidy, chinolony nowej generacji (moksifloksacyna, lewofloksacyna), ewerinomycyna, minocyklina.

Jako pierwsza pojawiła się oporność pneumokoków na penicylinę, a następnie na niemal wszystkie podstawowe grupy antybiotyków: inne niż penicylina β-laktamy, makrolidy, linkozamidy, tetracykliny, kotrimoksazol, chloramfenikol, fluorochinolony. Obniżoną wrażliwość na penicylinę po raz pierwszy wykazano w warunkach laboratoryjnych już w 1943 roku, zaraz po wprowadzeniu leku do użytku. Pierwszy oporny izolat kliniczny stwierdzono w 1965 roku w Bostonie [36], zaś pierwszą infekcję wywołaną przez oporny szczep opisano w 1967 roku w Australii [27].

Oporność na penicylinę jest konsekwencją wielostopniowych mutacji i powstawania różnych genów – *pbp*1a, 1b, 2a, 2x i 2b, 3, odpowiedzialnych za syntezę białek wiążących penicylinę o zmienionym powinowactwie do penicyliny (PBP-2b, PBP-2x, PBP-1a), często połączonym ze zróżnicowanym powinowactwem do innych antybiotyków β-laktamowych [26]. W zależności od stopnia oporności pneumokoki dzieli się na: w pełni wrażliwe (PSSP) – MIC ≤0,06 μg/ml, o umiarkowanym (PISP) – 0,12–1 μg/ml, i wysokim stopniu oporności (PRSP) – ≥2 μg/ml. Skuteczność wobec szczepów średnio wrażliwych na penicylinę ma amoksycylina w podwyższonych dawkach oraz niektóre cefalosporyny II, III i IV generacji, natomiast aktywność wobec PRSP mogą wykazywać cefalosporyny III i IV generacji oraz antybiotyki glikopeptydowe. Wykazano, że tam, gdzie narasta oporność pneumokoków na β-laktamy, jeszcze szybciej narasta na pozostałe antybiotyki, na które pneumokoki były zwykle wysoce wrażliwe.

Oporność pneumokoków na makrolidy może być uwarunkowana obecnością dwóch różnych genów:

fenotyp oporności krzyżowej MLS_B na makrolidy (MIC ≥64 μg/ml), linkozamidy i streptograminy związany z metylacją rybosomalnego miejsca receptorowego (gen *erm*B) oraz fenotyp M oporny tylko na makrolidy (MIC 1–32 μg/ml) w wyniku czynnego usuwania leku z komórki (gen *mef*A) [48]. Opisano również szczepy o podobnych fenotypach, nieposiadające wymienionych genów jak również posiadające oba geny. Za oporność na makrolidy mogą także odpowiadać zmiany wysoko konserwatywnego regionu w domenie V 23RNA wiążącego makrolidy w białkach rybosomalnych (geny *erm, erm*A) [14].

Z opornością na tetracykliny są związane geny *tet*M, O, K, L, odpowiedzialne za produkcję ochronnych białek cytoplazmatycznych o wysokim powinowactwie do antybiotyku, a przez to uniemożliwiające jego łączenie się z miejscem receptorowym 23S rRNA w komórkach bakterii [13]. Jest to jedyny znany mechanizm oporności na tetracykliny u pneumokoków i w znacznej większości dotyczy genu *tet*M, który cechuje budowa mozaikowa i heterogenność w populacji. Warunkuje to różny profil oporności na tetracykliny (tj. tetracyklinę, doksycyklinę i minocyklinę) oraz świadczy o ciągłej rekombinacji i horyzontalnym transferze genu w obrębie i pomiędzy gatunkami [15].

Z opornością na kotrimoksazol związane są zarówno mutacje punktowe i duplikacje, jak i rekombinacja wewnątrzgatunkowa genów zlokalizowanych w chromosomie bakteryjnym, kodujących alternatywne enzymy szlaku kwasu foliowego (geny *dfr fol*A, *fol*B, *sulA*).

Oporność na fluorochinolony determinuje głównie mutacja punktowa chromosomalnych genów topoizomerazy IV (*par*C, i/lub *par*E) i gyrazy (gen *gyr*A), rzadziej występowanie genu *nor* i *pmr*A kodującego pompę wypompowującą leki z komórki oraz genu *omp*F kodującego białka kanałów porowych, przez które wpływa antybiotyk.

Oporność na chloramfenikol warunkowana jest obecnością genu *cat* i enzymatyczną inaktywacją leku przez acetylotransferazę [17].

Oporność nie jest zjawiskiem jednorodnym i stałym. Ma związek z konsumpcją i polityką antybiotykową prowadzoną w danym regionie geograficznym [4]. Gwałtowne narastanie oporności na leki β-laktamowe oraz antybiotyki z innych grup, obserwowane od lat 80-tych zmusiło do monitorowania tego procesu przez liczne wieloośrodkowe programy oraz badania lokalne w wielu krajach. Z badań epidemiologicznych prowadzonych w Polsce od 1993 roku wynika, że odsetek szczepów o obniżonej wrażliwości na penicylinę, w zależności od miejsca izolacji waha się w granicach 12–20% [54], co odpowiada średniej europejskiej (18,2%) [2]. W wielu krajach dużym problemem jest szybki wzrost oporności *S. pneumoniae* na makrolidy [33], a także wysokie odsetki oporności na kotrimoksazol (24.8%) i tetracykliny [2, 6]. Szczególnie niepokojący jest fakt współwystępowania oporności na wiele antybiotyków jednocześnie. W przypadku oporności na antybiotyki należące do trzech i więcej grup używa się pojęcia tzw. wielooporności (MDR – multi drug resistance). Pierwsze MDR pneumokoki opisano już w 1978 roku [32]. Takie szczepy, jako bardziej oporne na próby eliminacji, wykazują szczególną łatwość klonalnego szerzenia się. Wyizolowano i opisano wiele klonów wieloopornych o zasięgu narodowym, a także kilka, które zyskały miano szczepów pandemicznych ($Spain^{23F}$-1; $Spain^{6B}$-2 i $Spain^{9V}$-3). Organizmy te posiadają pełną wirulencję i ograniczają się do kilku serotypów: 6A, 6B, 9V, 14, 19A i 23F [42]. W Polsce w latach 90-tych wykryto obecność dwóch z nich ($Spain^{23F}$-1 i $Spain^{9V}$-3), a także opisano kolejne dwa epidemiczne klony narodowe o serotypach 6B i 23F [46].

Zwiększenie częstości zakażeń i przypadków niepowodzeń klinicznych wywołanych przez pneumokoki o zmniejszonej wrażliwości na penicylinę i inne antybiotyki spowodowało, że WHO uznało *S. pneumoniae* za jeden z patogenów alarmowych. W 1997 roku powstała międzynarodowa grupa ekspertów, w udziałem Polski – Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN), której celem jest charakterystyka, nomenklatura, standaryzacja i klasyfikacja klonów epidemicznych, a także rozpowszechnianie tych informacji [42]. Stworzono kolekcję wzorców przedstawicieli klonów epidemicznych zdeponowaną w Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (ATCC – American Type Culture Collection) oraz bazy danych określających serotyp, wzór antybiotykooporności, profil genu *pbp*, rodzaj genu oporności na makrolidy oraz wzory PFGE i MLST, ogólnodostępne pod adresem internetowym www.sph.emory.edu/pmen.

Początkowo opisano 16 klonów międzynarodowych, aktualnie za klony epidemiologiczne uznano 43 szczepy, a scharakteryzowano 26 klonów, w tym dwa zidentyfikowane po raz pierwszy w Polsce – klony $Poland^{23F}$-16 i $Poland^{6B}$-20. Oba polskie są wieloopornymi klonami: $Poland^{23F}$-16 wykazuje oporność na penicylinę – MIC 8 μg/ml, cefotaksym – 8 μg/ml, erytromycynę – 8 μg/ml, tetracyklinę – 16 μg/ml oraz chloramfenikol – 16 μg/ml, kotrimoksazol – 4/76 μg/ml, natomiast $Poland^{6B}$-20 jest średniowrażliwy na penicylinę – MIC 0,12 μg/ml, ale wrażliwy na cefotaksym i chloramfenikol oraz oporny na erytromycynę – 8 μg/ml i tetracyklinę – 16 μg/ml [42].

W krajach Uni Europejskiej funkcjonuje Europejski Program Monitorowania Oporności na Antybiotyki (EARSS – European Antibiotic Resistance Surveilance System), z którym Polska współpracuje [21]. Szereg polskich laboratoriów uczestniczy w innych międzynarodowych sieciach monitorowania oporności

(np. Projekt Alexander, GRASP, SENTRY, ENARE). W 1997 roku Minister Zdrowia powołał Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekooporności Drobnoustrojów, Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Bakteryjnych Zapaleń Ośrodkowego Układu Nerwowego oraz patronuje resortowemu programowi OPTY monitorującemu oporność w sieci 30 szpitali. Na bazie krajowych danych epidemiologicznych gatunku ustalane są zalecenia i wytyczne racjonalnej antybiotykoterapii. Taka strategia powoduje zmniejszenie szansy powstawania i rozprzestrzenia się opornych drobnoustrojów. Stała aktualizacja wytycznych racjonalnej antybiotykoterapii ma na uwadze nie tylko sukces kliniczny, ale również eradykację drobnoustroju z miejsc nosicielstwa, a więc sukces mikrobiologiczny.

Ponadto poszukuje się nie tylko nowych skutecznych leków przeciwpneumokokowych omijających powstałe mechanizmy oporności, ale również innych opcji terapeutycznych. Jak dotąd, najbardziej skuteczną i coraz częściej stosowaną w praktyce wydaje się być profilaktyka szczepionkowa.

6. Profilaktyka

Rosnąca liczba osób ze schorzeniami predysponującymi do wystąpienia ciężkich inwazyjnych zakażeń pneumokokowych, jak również narastanie oporności na antybiotyki, wymagają nowoczesnych działań profilaktycznych. Sukces kliniczny dotychczasowych szczepień uzasadnia podejmowanie wysiłków w celu wprowadzenia narodowych programów zapobiegania inwazyjnym zakażeniom wywoływanym przez *S. pneumoniae.* Szczepienia pozwalają na poprawę jakości życia chorych z grup ryzyka oraz zmniejszenie kosztów – koszty leczenia zapalenia płuc są znacznie wyższe niż stosowania szczepionek pneumokokowych [19].

Pierwsze prace nad produkcją szczepionki przeciw pneumokokom podjęto na początku XX wieku, jednak przerwano w związku z wprowadzeniem skutecznych antybiotyków. Pojawienie się antybiotykooporności wywołało ponowne zainteresowanie szczepionkami. Udane próby immunizacji 4, a później 6 serotypami miały miejsce już w 1945 roku, jednak pierwszą skuteczną, 14-walentną szczepionkę zarejestrowano dopiero w 1977 roku, a w 1983 wprowadzono stosowaną do dziś szczepionkę 23-walentną – PPV23 [40]. Głównym składnikiem szczepionki jest wielocukrowa otoczka.

Spośród 90 serotypów, odpowiedzialne za wywoływanie zakażeń inwazyjnych są: 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, inne dodatkowo wykazują łatwość kolonizacji i szerokie klonalne rozprzestrzenienie oraz znaczny stopień oporności (6B, 9V, 14, 19 i 23F) [29, 30, 40]. Serotypy te występują z różną częstością w różnych grupach populacyjnych i regionach geograficznych. W Europie od 1975 roku najpopularniejszymi serotypami są: 14–18,7%, 6–15,4%, 19–12,7%, 18–9,6%, 23–8,1%, 9–6,3%, 1–6,1%, 7–4,7%, 4–3,6%, 5–2,1% [28].

Otoczkowe typy serologiczne zawarte w 23-walentnej szczepionce (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, i 33F), obejmują serotypy odpowiedzialne za ponad 90% inwazyjnych zakażeń u dorosłych, 70–80% odpowiedzialnych za zapalenie ucha środkowego, 88% opornych na penicylinę [10]. Obliczono, że szczepionka pozwala na redukcję do 83% inwazyjnych zakażeń wywołanych szczepami penicylinoniewrażliwymi wchodzącymi w skład szczepionki i aż 73% wszystkich inwazyjnych [31]. Niestety, szczepionka nie rozwiązuje problemu zakażeń nieinwazyjnych u dzieci i nie eliminuje nosicielstwa, a więc nie ma znaczenia epidemiologicznego [50]. Po podaniu jednorazowej dawki odpowiedź poszczepienna utrzymuje się 3 do 10 lat, w zależności od wieku pacjenta, schorzeń towarzyszących i kontaktów z pneumokokami w naturze. Dawka przypominająca wymagana jest u osób z osłabioną odpornością w okresie 3–5 lat od pierwszego szczepienia. Ze względu na niską immunogenność antygenów wielocukrowych, szczepionka nie jest skuteczna u dzieci poniżej 2 roku życia i cechuje się również słabszą immunogennością u dzieci poniżej 7–8 roku oraz w grupach pacjentów z upośledzoną odpornością.

Szczepionki nowej generacji, dzięki połączeniu polisacharydów otoczkowych z nośnikiem białkowym stały się bardziej immunogenne i dają wysoką skuteczność w grupie dzieci od 6 tygodnia do 2 roku życia oraz u osób z obniżoną odpornością. Skojarzone z toksoidem błoniczym CRM197 zawierają antygeny otoczkowe serotypów 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F (7-walentna), 9-walentana dodatkowo 1 i 5, a 11-walentna 3 i 7F [1]. Obejmują ponad 90% serotypów izolowanych od dzieci z posocznicą i zapaleniem opon mózgowordzeniowych oraz 60–70% serotypów odpowiedzialnych za zapalenie ucha środkowego u dzieci [11]. Zgodność populacji pneumokoków ze spektrum zawartym w szczepionkach jest większa w USA, gdzie przygotowano skład szczepionki – 85–90%, niż w Europie – 68–81% [28]. Porównanie danych z lat 1994–2000 z danymi w rok po wprowadzeniu obowiązkowych szczepień w USA wykazało spadek o 58% w 2001 i 66% w 2002 roku częstości inwazyjnych zakażeń pneumokokowych u dzieci do 2 roku życia, a o 63% i 77% wywołanych typami szczepionkowymi oraz wzrost liczby zakażeń szczepami nieszczepionkowymi o 28% i 66% [35]. Inne badania udowodniły skuteczność szczepionek koniugowanych także w redukcji zachorowań na zapalenie płuc i ucha środkowego oraz nosicielstwa pneumokoków w drogach oddechowych.

Zaobserwowano również zmniejszenie częstości zakażeń pneumokokowych u osób nieszczepionych i dorosłych, dla których rezerwuarem są dzieci [55]. Zamierzonym efektem wprowadzenia szczepień jest nie tylko redukcja zachorowalności, ale także eliminacja z populacji krążących penicylinooopornych i wielooopornych szczepów [7].

Liczne doniesienia wskazują, że szczepienia prowadzą do eliminacji z populacji szczepów o serotypach szczepionkowych i zastępowania ich przez szczepy nieszczepionkowe [7, 38]. Zasięg, czas i znaczenie kliniczne tego zjawiska nie są jeszcze znane. Biorąc pod uwagę ogromne zdolności przystosowawcze pneumokoków można spodziewać się zarówno transferu oporności między szczepami o serotypach szczepionkowych i nieszczepionkowych, jak również serotypów pomiędzy szczepami wrażliwymi i opornymi [7, 12]. Uzasadnia to potrzebę monitorowania tego procesu i ewentualnej zmiany składu szczepionki w przyszłości. Trwają także prace nad uzyskaniem innych skutecznych szczepionek, z uwzględnieniem białek powierzchniowych (np. PspC, PsaA, Cbp) [9, 49].

Do niedawna zarejestrowane były dwie szczepionki 23-walentne: Pneumo 23 i Pneumovax 23, zalecane jako ważna opcja terapeutyczna w grupach ryzyka u osób powyżej 2 roku życia. Obecnie dostępna jest również szczepionka skoniugowana 7-walentna Prevenar.

7. Podsumowanie

S. pneumoniae to patogen o szczególnych właściwościach umożliwiających przetrwanie i rozprzestrzenianie się w organizmie ludzkim. Zmienność antygenowa, będąca konsekwencją polimorfizmu na poziomie genów ułatwia pneumokokom unikanie mechanizmów obronnych makroorganizmu w trakcie kolonizacji tkanek i rozwój procesu zapalnego, a także determinuje oporność na próby ich eliminacji.

Trwają badania naukowe mające na celu poznanie mechanizmów oporności, ich szerzenie się w obrębie i pomiędzy gatunkami oraz rozprzestrzenianie się w środowisku. Zjawisko to wykazuje znaczne zróżnicowanie geograficzne i regionalne, uwarunkowane jest stosowaną lokalnie polityką antybiotykową i wymaga stałego, wieloośrodkowego monitorowania.

Śledzenie typów serologicznych na danym terenie ma swoje uzasadnienie i praktyczne zastosowanie w świetle profilaktyki szczepionkowej, która w dobie narastającej antybiotykooporności staje się najważniejszą alternatywą zwalczania zakażeń pneumokokowych. Warto zachęcać do szerszego korzystania z szczepionek przeciwpneumokokowych, szczególnie nowej generacji.

Piśmiennictwo

1. Advisory Commitee on Immunization Practices: Preventing pneumococcal diseases among infants and young children. Recomendations of the Advisory Commitee on Immunisation Practices (ACIP). *MMWR Recom. Rep.* **49**,1–35 (2000)
2. Alex Jacobs M.R., Felmingham D., Appelbaum P.C., Reuben N.G., Grünberg N., the Alexander Project Group: The Alexander Project 1998–2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 229–246 (2003)
3. Alonso DeVelasco E., Verheul A.F., Verhoef J., Snippe H.: *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol. Rev.* **59**, 591–603 (1995)
4. Appelbaum P.C.: Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 77–83 (1992)
5. Austrian R.: The Gram stain and the etiology of lobar pneumoniae, an historical note. *Bacteriol. Rev.* **24**, 261–265 (1960)
6. Baquero F.: Trends in antibiotic resistance of respiratory pathogenes: an analysis and commentary on a collaborative surveillance study. *J. Antimicrob. Chemoth.* **38**, Suppl. A: 117–132 (1996)
7. Bernatoniene J., Finn A.: Advances in pneumococcal vaccines-advanctages for infants and children. *Drugs*, **65**, 229–256 (2005)
8. Boulnois G.J.: Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by Streptococcus pneumoniae. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 249–259 (1992)
9. Brooks-Walter A., Briles D.E., Hollingshead S.K.: The pspC gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteriemia. *Infect. Immun.* **67**, 6533–6542 (1999)
10. Butler J.C., Breiman R.F., Campbell J.F., Lipman H.B., Broome C.V., Facklam R.R.: Pneumococcal vaccine efficacy. An evaluation of current recommendations. *JAMA*, **270**, 1826–1831 (1993)
11. Butler J.B., Breiman R.F., Lipman H.B., Hofmann J., Facklam R.R.: Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States 1978–94: implications for development of a coniugate vaccine. *J. Infect. Dis.* **171**, 885–889 (1995)
12. Coffey T.J., Dowson C.G., Daniels M., Zhou J., Martin C., Spratt B.G., Musser J.M.: Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **5**, 2255–2260 (1991)
13. Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., Taylor D.E.: Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3675–3681 (2003)
14. Depardieu F., Courvalin P.: Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16-membered macrolides and streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **45**, 319–323 (2001)
15. Doherty N., Trzcinski K., Pickerill P., Zawadzki P., Dowson C.G.: Genetic diversity of the *tet(M)* gene in tetracycline resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2979–2984 (2000)
16. Dowson C.G., Barcus V., King S., Pickerill P., Whatmore A., Yeo M.: Horizontal gene transfer and the evolution of resis-

tance and virulence determinants in *Streptococcus*. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 42–51 (1997)
17. Dzierżanowska D.: Antybiotykoterapia praktyczna. Bielsko-Biała, α-media press, 2000
18. Faden H., Duffy L., Wasielewski R., Wolf J., Krystofik D., Tung Y.: Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J. Infect. Dis.* **175**, 1440–1445 (1997)
19. Fedson D.S.: Pneumococcal vaccine in the prevention of community-acquired pneumonia; an opimistic viev of cost-effectivens. *Semi. Respir. Infect.* 8, 285–293 (1993)
20. Feldman C., Klugman K.P.: Pneumococcal infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **10**, 109–115 (1997)
21. Goettsch W., Bronzwaer S.L., De Neeling A.J., Wale M.C., Aubry-Damon H., Olsson-Liljequist B.: Standardization and quality assurance for antimicrobial resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* with the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). *Clin. Microbiol. Infect.* **6**, 59–63 (2000)
22. Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C.: Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.* **142**, 923–933 (1980)
23. Greenwood B.: The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **354**, 777–785 (1999)
24. Grzesiowski P., Betlejemska K., Hryniewicz W.: Immunoprofilaktyka zakażeń *Streptococcus pneumoniae* wobec narastającej oporności na leki przeciwbakteryjne. Medycyna Zakażeń. *Nowa Med.* **9**, 93 (1999)
25. Grzesiowski P.. Skoczyńska A., Albrech P.: Prospective study on the incidence of pneumococcal disease in hospitalized children up to 5 years in Poland. 4th World Congress of thr World Society for Pediatric Infectious Disease, Warszawa, 2005, str. 87
26. Hakenbeck R., Kamiński K., Konig A., van der Linden M., Paik J., Reichmann P.: Penicillin-binding proteins in β-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **5**, 91–99 (1999)
27. Hansman D., Bullen M.M.: A resistant pneumococcus (letter). *Lancet*, **2**, 264–265 (1967)
28. Hausdorf W.P., Bryant J., Paradiso P.R., Sieber G.R.: Which pneumococcal serogrups cause the most invasive disease: implications for conjugate formulation and use, part I. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 100–121 (2000)
29. Hausdorff W.P.: Invasive pneumococcal disease in children: geographic and temporal variations in incidence and serotype distribution. *Eur. J. Pediatr.* **16**, 135–139 (2002)
30. Hausdorff W.P., Feikin D.R., Klugman K.P.: Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 83–93 (2005)
31. Hutchison B.G., Oxman A.D., Shannon H.S., Lloyd S., Altmayer C.A., Thomas K.: Clinical effectiveness of pneumococcal vaccine meta-analysis. *Can. Fam. Phisician*, **45**, 2381–2393 (1999)
32. Jacobs M.R., Koornhof H.J., Robins-Browne R.M., Stevenson C.M., Vermaak Z.A., Freiman I.: Emergence of multiply resistant pneumococci. *N. Engl. J. Med.* **299**, 735–740 (1978)
33. Jacobs M.R., Johnson C.E.: Macrolide resistace: an increasing concern for treatment failure in children. *Ped. Infect. Dis. J.* **22**,131–138 (2003)
34. Jedrzejas M.J.: Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 187–207 (2001)
35. Kaplan S.L., Mason Jr E.O., Wald E.R., Schutze G.E., Bradley J.S., Tan T.Q.: Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics,* **113**, 443–449 (2004)
36. Kislak J.W., Razavi L.M.B., Daly A.K., Finland M.: Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am. J. Med.* **250**, 261–268 (1965)
37. Klugman K.P.: Pneumococcal Resistance to Antibiotics. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 171–196 (1990)
38. Klugman K.P.: Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines and their effect on carriage and antimicrobial resistance. *Lancet Infect. Dis.* **1**, 85–91 (2001)
39. Kristinsson K.G.: Effect of antimicrobial use and other risk factor on antimicrobial resistance in pneumococci. *Microb. Drug Resist*. **3**, 117–123 (1997)
40. Lund E., Henrichsen J.: Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae. Methods Microbiol.* **12**, 241–262 (1978)
41. Markiewicz Z., Tomasz A.: Variation in pennicillin-binding protein patterns of penicillin-resistant clinical isolates of pneumococci. *J. Clin. Microb.* **27**, 445–465 (1989)
42. McGee L., McDougal L., Zhou J., Spratt B.G., Tenover F.C., George R.: Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* definied by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2565–2571 (2001)
43. Meats E., Brueggemann A.B., Enright M.C., Sleeman K., Griffiths D.T., Crook D.W.: Stability of serotypes during nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 386–392 (2003)
44. Musher D.M.: Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 801–807 (1992)
45. Nava J.M., Bella F., Garau J., Lite J., Morera M.A., Martí C.: Predictive factors for invasive disease due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: apopulation-based study. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 884–990 (1994)
46. Overweg K., Hermans P.W.M., Trzcinski K., Sluijter M., de Groot R., Hryniewicz W.: Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: identification of emerging clones. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1739–1745 (1999)
47. Raymond J., Le Thomas I., Moulin F., Commeau A., Gendrel D., Berche P.: Sequential colonization by *Streptococcus pneumoniae* of healthy children living in an orphanage. *J. Infect. Dis.* **181**, 1983–1988 (2000)
48. Roberts M.C., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L.B., Rood J., Seppälä H.: Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2823–2830 (1999)
49. Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortqvist A.: Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonisation and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**, 819–829 (1997)
50. Schrag S.J., Beall B., Dowell S.F.: Limiting the spread of resistant pneumococci: biological and epidemiologic evidence for the effectiveness of alternative interventions. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 588–601 (2000)
51. Semczuk K., Łopaciuk U., Dzierżanowska-Fangrat K., Gabińska E., Dmeńska H., Dzierżanowska D.: Analiza wrażliwości *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* wyodrębnionych z materiałów

klinicznych od dzieci z zakażeniami dróg oddechowych leczonych w IP-CZD w latach 1999–2002. *Pediatr. Pol.* **78**, 173–180 (2003)
52. Skoczyńska A., Kadłubowski M., Hryniewicz W.: Inwazyjna choroba meningokokokowa i inne bakteryjne zakażenia ośrodkowego układu nerwowego – zasady postępowania. *Przew. Lek.* **8**, 28–30 (2005)
53. Tomasz A.: The the role autolisins in cell death. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **235**, 439–447 (1974)
54. Trzciński K., Hryniewicz W., Grupa robocza Projektu Aleksander: Antimicrobial susceptibility of common bacterial pathogens isolated from lower respiratory tract infections in Poland in 1996 – the Alexander Project. *Med. Sci. Monit.* **3**, 714–722 (1997)
55. Whitney C.G., Barley M.M., Handler J.: Decline in invasive pneumococcal diseease after the introduction of protein-polysaccharyde cojugate vaccine. *N. Eng. J. Med.* **349**, 715–716 (2003)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 339–344
http://www.pm.microbiology.pl

SZPITALNE BAKTERIEMIE ENTEROKOKOWE

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Marek Bronk*, Alfred Samet

Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej, ACML, ACK-Szpital AMG
ul. Dębinki 7, 80-952 Gdańsk, tel. (58) 344 68 95
* Autor korespondencyjny: e-mail: msb@amg.gda.pl

1. Wprowadzenie. 2. Ogólna charakterystyka enterokoków. 3. Zjadliwość enterokoków. 4. Zakażenia wywoływane przez enterokoki. 5. Enterokokowe zakażenia krwi. 6. Podsumowanie

Hospital enterococcal bacteremias

Abstract: The role of enterococci as nosocomial pathogenes has been increasing for the last 20 years. The most important infections are those involving bloodstream. Nearly 5% of all microorganisms isolated from blood belong to the genus *Enterococcus*. In patients with hospital acquired infections they are responsible for 10% of bacteremia cases and in patients from intensive care units, haematology or oncology wards even 20%. The majority of bacteremias is caused by *E. faecalis*, however the incidence of *E. faecium* infections is increasing. It is especially true in haematology wards where they may be the etiological cause of even 80% of bacteremias. Other enterococci are only seldom involved in bacteremia. Enterococcal bloodstream infections are most prevalent in patients with haematological malignancies.

1. Introduction. 2. General characteristics of enterococci. 3. Enterococcal virulence. 4. Infections caused by enterococci. 5. Enterococcal bacteremias. 6. Summary

Słowa kluczowe: bakteriemia, sepsa, enterokoki, *Enterococcus*
Key words: bacteremia, sepsis, enterococci, *Enterococcus*

1. Wprowadzenie

Drobnoustroje wywołujące posocznicę u pacjentów hospitalizowanych ulegają ciągłym zmianom. Dotyczy to zarówno gatunków drobnoustrojów wywołujących to ciężkie zakażenie jak i ich wrażliwości na antybiotyki. W ciągu 65 lat stosowania antybiotyków w leczeniu zakażeń u człowieka podstawowe zmiany dotyczyły udziału w zakażeniach bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz drożdżaków. W niektórych opracowaniach dodatkowo zwracano uwagę na udział bakterii beztlenowych. W obrębie wymienionych grup drobnoustrojów zmieniają się również gatunki będące dominującym czynnikiem etiologicznym posocznicy. Dobrym przykładem zmiany znaczenia wybranych gatunków bakterii jako czynnika etiologicznego zakażenia krwi są enterokoki. Drobnoustroje te przez wiele lat nie odgrywały znaczniejszej roli jako czynnik etiologiczny zakażeń u ludzi. Są one ważnym drobnoustrojem wywołującym zapalenia wsierdzia, ale utrzymująca się ciągle wrażliwość *Enterococcus faecalis* na penicyliny umożliwia skuteczne leczenie tego zakażenia. Mogą być czynnikiem etiologicznym zakażenia dróg moczowych, prostaty, ran i jamy brzusznej po zabiegach operacyjnych lub perforacji jelit.

W ciągu ostatnich 20 lat, rola enterokoków, jako drobnoustrojów wywołujących zakażenia szpitalne znacznie wzrosła. Szczególnie zauważalny jest wzrost ich znaczenia jako czynnika etiologicznego posocznicy, zakażenia ran i zakażenia dróg moczowych. Czynnikiem decydującym o rosnącej liczbie zakażeń enterokokowych jest z jednej strony znaczna naturalna oporność tych bakterii na antybiotyki, z drugiej bardzo rozpowszechnione w tym okresie stosowanie do leczenia zakażeń antybiotyków z grupy cefalosporyn, na które drobnoustroje te są naturalnie oporne.

Spośród około 30 gatunków zaliczanych do rodzaju *Enterococcus*, większość zakażeń u człowieka wywołuje *Enterococcus faecalis.* Według różnych opracowań jest on czynnikiem etiologicznym od 70% do 90% zakażeń wywołanych przez ten rodzaj bakterii. Drugim gatunkiem jest *E. faecium* – 5–25% zakażeń enterokokowych. Pozostałe 5% wywołują: *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus.* Inne gatunki u ludzi występują sporadycznie.

2. Ogólna charakterystyka enterokoków

Enterokoki są Gram-dodatnimi ziarenkowcami, występującymi powszechnie w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt jako normalny składnik flory fizjologicznej. Ich obecność stwierdza się również często w żywności, ściekach i wodzie [4, 5, 20].

Komórki bakterii z rodzaju *Enterococcus* mają kształt kulisty lub owalny, barwią się Gram-dodatnio. Przestrzennie układają się w pary lub łańcuszki o różnej długości w zależności od warunków hodowli. Nie posiadają rzęsek, z wyjątkiem należących do gatunku *E. casseliflavus* i bardzo rzadko niektórych szczepów

E. faecalis. Nie tworzą również typowych otoczek, aczkolwiek spotykano szczepy produkujące niewielkie ilości materiału śluzowego. Cechami diagnostycznymi odróżniającymi enterokoki od innych tlenowo rosnących Gram-dodatnich bakterii kulistych są: brak aktywności katalazy (różnicuje enterokoki od gronkowców), wzrost w bulionie zawierającym 6,5% NaCl, wzrost na podłożu zawierającym 40% żółci, przeżywalność w temp. 60°C przez 30 min oraz wzrost w bulionie o pH 9,5 co odróżnia enterokoki od paciorkowców [4, 5, 8, 20].

Enterokoki należą do paciorkowców grupy D według L a n c e f i e l d [11]. Przynależność do tej grupy nie jest jednoznaczna z zakwalifikowaniem tych bakterii do rodzaju *Enterococcus*, ponieważ w tej grupie występują również tzw. gatunki „nieenterokokowe" (np. *Streptococcus bovis*), u których nie występują wszystkie, wcześniej wymienione cechy diagnostyczne.

Drobnoustroje należące do gatunku *E. faecalis* występują w jelicie grubym u około 90% ludzi zdrowych. *E. faecium* występuje znacznie rzadziej, u około 10% osób zdrowych [4, 5, 19, 20]. Gatunki te w niewielkiej ilości występują również w jamie ustnej, pochwie i na skórze. Pozostałe gatunki spotyka się sporadycznie, a niektórych nigdy nie wyizolowano od ludzi. Wszystkie gatunki występują z różną częstością w przewodzie pokarmowym zwierząt [1, 2, 4, 7, 19, 20].

3. Zjadliwość enterokoków

U bakterii z rodzaju *Enterococcus* wykryto szereg czynników warunkujących chorobotwórczość. Są to: cytolizyna (hemolizyna), żelatynaza, proteaza serynowa, białko wiążące kolagen (Ace), białko wiążące fibrynogen (SagA), substancja agregująca (AS), zewnątrzkomórkowe białko powierzchniowe (Esp), adhezyny ściany komórkowej (białko Efa), wytwarzanie nadtlenków, hialuronidaza, kwasy lipotejchojowe, DNAza, lipaza, otoczka polisacharydowa.

Szczepy enterokoków posiadające czynniki zjadliwości wywołują w testach *in vivo* zakażenia o cięższym przebiegu niż szczepy ich pozbawione. Jako dodatkowy czynnik zjadliwości rozpatruje się znaczną, naturalną i nabytą oporność enterokoków na antybiotyki. Cecha ta umożliwia przetrwanie tym drobnoustrojom w warunkach szpitalnych, gdzie są poddawane stałej presji antybiotykowej.

4. Zakażenia wywoływane przez enterokoki

W materiale klinicznym pobieranym od ludzi najczęściej występuje gatunek *E. faecalis*, do którego należy 70–80% wszystkich izolatów enterokoków. Na drugim miejscu znajduje się *E. faecium* stanowiący 10–15% ogółu enterokoków. Około 3% izolatów enterokoków należy do gatunku *E. durans*, 1% do *E. avium*. Pozostałe gatunki stanowią razem około 1% ogółu enterokoków występujących w próbkach materiałów pobieranych od ludzi [4, 5, 19, 20].

Translokacja enterokoków z przewodu pokarmowego, będącego miejscem ich naturalnego występowania, do przestrzeni i tkanek naturalnie jałowych prowadzi do rozwoju zakażenia. Enterokoki wywołują zakażenia układu moczowego, zakażenia ran, zapalenia wsierdzia, zakażenia krwi (posocznice), zakażenia narządów wewnętrznych w obrębie miednicy mniejszej, jamy brzusznej i klatki piersiowej oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i posocznice u noworodków [3–6, 13, 15–20]. Są jednym z głównych czynników etiologicznych zapalenia gruczołu krokowego [4]. Często wchodzą one w skład zespołu różnych gatunków bakterii tlenowych i beztlenowych, wywołując zakażenia o charakterze mieszanym. W tych przypadkach nierzadko trudno jest określić rolę enterokoków w toczącym się procesie zapalnym. Uważa się, że drobnoustroje z rodzaju *Enterococcus* wywołują około 10% zakażeń miejscowych i 5% zakażeń krwi u pacjentów leczonych w szpitalach [4, 5, 9, 19].

Rola enterokoków jako drobnoustrojów wywołujących zakażenia szpitalne w ostatnich dwóch dekadach szybko rosła z powodu ich naturalnej oporności na szeroko w tym czasie stosowane antybiotyki z grupy cefalosporyn. Wiąże się to również z nabywaniem przez nie oporności na wysokie stężenia aminoglikozydów i antybiotyki glikopeptydowe (wankomycyna i teikoplanina). Nie działają na nie antybiotyki z grupy linkozamidów. Aktywność wykazują jedynie penicyliny, tetracykliny, chloramfenikol, glikopeptydy, linezolid i niektóre fluorochinolony [12]. Penicylina benzylowa w połączeniu z gentamycyną działa synergistycznie na większość enterokoków, natomiast w połączeniu ze streptomycyną wykazuje takie działanie w stosunku do ok. 40% szczepów. Brak synergizmu wiąże się z wyjątkowo wysoką opornością na streptomycynę i/lub gentamycynę występującą u niektórych szczepów enterokoków [12]. Jest ona wynikiem powstałych na drodze mutacji zmian rybosomalnych białek wiążących streptomycynę i gentamycynę [12]. Wysoki poziom oporności na te antybiotyki może występować niezależnie od siebie. Brak synergizmu działania penicylin i aminoglikozydów na enterokoki może być związany również z enzymami modyfikującymi aminoglikozydy [12]. Enzymy te, do których należą acetylotransferazy, fosfotransferazy i nukleotydylotransferazy, modyfikują cząsteczki antybiotyku, w wyniku czego staje się on nieaktywny [12]. U podstawy całkowitej lub względnej oporności enterokoków na penicylinę leży wytwarzanie białek PBP

o niskim powinowactwie do tego antybiotyku [5, 12, 20]. U niektórych szczepów enterokoków wykazano również enzymatyczny mechanizm oporności na penicyliny [4, 5, 12, 14].

5. Enterokokowe zakażenia krwi

Głównymi miejscami wyjścia enterokokowych zakażeń krwi są: przewód pokarmowy, zakażone drogi moczowe, zakażone tkanki miękkie, zakażenia w obrębie jamy brzusznej i cewniki naczyniowe. Kolonizacja skóry pacjenta przez enterokoki zwiększa ryzyko zakażenia cewnika naczyniowego, a następnie zakażenia krwi. Badania nad enterokokowymi zakażeniami krwi doprowadziły do opisania różnych modeli wyjaśniających rozwój tego zakażenia. Jeden z nich zakłada, że naruszenie naturalnej równowagi panującej w organizmie między bakteriami wchodzącymi w skład flory fizjologicznej a układem odpornościowym, skutkuje przełamaniem przez bakterie miejscowych barier immunologicznych i wywołaniem zakażenia. Taki przebieg zakażenia krwi (w tym wywołanego przez enterokoki) występuje u pacjentów z neutropenią i chorobami nowotworowymi. U tych chorych enterokoki z przewodu pokarmowego (nawet nieuszkodzonego) przenikają do układu krwionośnego wywołując zakażenie krwi [10].

Inny model zakłada początkową inwazję zjadliwych szczepów enterokoków do komórek nabłonkowych jelita, a następnie translokację do naczyń krwionośnych. Model ten wyjaśnia przebieg zakażenia u pacjentów bez upośledzonej odporności. Czynnikiem decydującym w tym przypadku jest posiadanie przez szczep wywołujący zakażenie zwiększonej zjadliwości, umożliwiającej przełamanie bariery immunologicznej organizmu.

Na podstawie licznych badań nad czynnikami etiologicznymi zakażeń krwi ustalono, że enterokoki wywołują około 5% wszystkich zakażeń krwi. Dotyczy to zakażeń występujących u wszystkich pacjentów, u których rozpoznano bakteryjne zakażenie krwi (bakteriemia, posocznica). Drobnoustroje te są częstszym czynnikiem etiologicznym zakażenia krwi u pacjentów leczonych w oddziałach intensywnej terapii oraz wśród chorych oddziałów hematologicznych i onkologicznych. W tych grupach wywołują nawet do 20% bakteriemii i posocznic.

U pacjentów leczonych w latach 2005–2007 w Akademickim Centrum Klinicznym (ACK) w Gdańsku enterokoki wywołały 18,08% bakteriemii. W Klinice Hematologii Dorosłych były czynnikiem etiologicznym 28,09% bakteriemii. W innych klinikach odsetek bakteriemii enterokokowych utrzymywał się na poziomie około 10% (tabela I).

Tabela I
Bakteriemie enterokokowe w wybranych klinikach ACK w Gdańsku

Klinika	Ogólna liczba bakteriemii	Liczba bakteriemii enterokokowych	Odsetek
Klinika Hematologii	598	168	28,09%
Kliniki chirurgiczne	542	51	9,40%
Kliniki internistyczne	681	65	9,54%
Klinika Intensywnej Terapii	348	36	10,34%
Razem	1769	320	18,08%

Tabela II
Drobnoustroje izolowane z posiewów krwi

Drobnoustroje	Liczba izolatów	Odsetek
Pałeczki Gram-ujemne	748	28,79%
Ziarenkowce Gram-dodatnie	1698	65,35%
w tym: *E. faecalis*	101	3,88%
E. faecium	217	8,35%
E. avium	1	0, 03%
E. gallinarum	1	0,03%
Drożdżaki	89	3,42%
Beztlenowce	37	1,42%
Pałeczki Gram-dodatnie	26	1.02%
Razem	2598	100%

Tabela III
Gatunki enterokoków izolowane z krwi od pacjentów ACK w Gdańsku

Gatunek	Liczba izolatów	Odsetek
E. faecalis	101	31,57%
E. faecium	217	67,81%
E. avium	1	0,31%
E. gallinarum	1	0,31%
Razem	320	100%

Wśród drobnoustrojów izolowanych z posiewów krwi pobranej od pacjentów leczonych w latach 2005–2007 w ACK w Gdańsku enterokoki stanowiły 12,29% ogólnej liczby izolatów (tabela II).

Należały one w większości do dwóch gatunków. Dominował gatunek *E. faecium* – 67,81% izolatów. Drugim gatunkiem był *E. faecalis* – 31,57% izolatów. Dwa pozostałe gatunki *E. avium* i *E. gallinarum* były reprezentowane przez pojedyncze izolaty (tabela III).

Tak duży udział gatunku *E. faecium* w wywoływaniu bakteriemii u pacjentów ACK wiąże się z utrzymującą się epidemią zakażeń wywoływanych przez wankomycyno-oporne szczepy tego gatunku w Klinice Hematologii Dorosłych. Jest to odwrotna sytuacja niż najczęściej spotykana, gdzie dominującym gatunkiem

Tabela IV
Gatunki enterokoków izolowane z krwi w wybranych klinikach ACK w Gdańsku

Klinika	Gatunek	Liczba izolatów	Odsetek
Klinika Hematologii	*E. faecalis*	21	12,50%
	E. faecium	147	87,50%
Kliniki chirurgiczne	*E. faecalis*	30	58,82%
	E. faecium	20	39,21%
	E. avium	1	1,96%
Kliniki internistyczne	*E. faecalis*	33	50,76%
	E. faecium	31	47,69%
	E. gallinarum	1	1,53%
Klinika Intensywnej Terapii	*E. faecalis*	17	47,22%
	E. faecium	19	52,78%

enterokoków wywołującym różne zakażenia, w tym bakteriemie, jest *E. faecalis*.

Udział poszczególnych gatunków enterokoków w wywoływaniu bakteriemii enterokokowych u pacjentów różnych klinik przedstawiał się odmiennie. W Klinice Hematologii Dorosłych gatunek *E. faecium* wywołał 87,50%, *E. feacalis* 12.50% bakteriemii enterokokowych. W klinikach chirurgicznych większość tych zakażeń wywołał *E. faecalis* – 58,82%, podobnie jak w klinikach internistycznych – 50,76%. W Klinice Intensywnej Terapii większość bakteriemii enterokokowych wywołał *E. faecium*, ale jego udział był znacznie niższy niż w Klinice Hematologii Dorosłych i wynosił 52,78%. Udział *E. faecium* w wywoływaniu zakażeń krwi u pacjentów leczonych w ACK jest wielokrotnie wyższy niż podawany w publikacjach (ok. 10–20%) i wynosi ok. 68% (tabela IV).

na glikopeptydy (wankomycyna, teikoplanina). Z kolei 112 izolatów *E. faecium* spośród 217 badanych, wykazywało oporność na tę grupę antybiotyków. Odsetek izolatów opornych na teikoplaninę był niższy niż w przypadku wankomycyny. Większość enterokoków opornych na wankomycynę (VRE) należała do fenotypu VanA charakteryzującego się wysoką opornością na wankomycynę i teikoplaninę. Tylko pojedyncze izolaty należały do fenotypów VanB i VanC. Wśród 320 izolatów enerokoków wyizolowanych z krwi cztery były oporne na linezolid. Należały one do gatunku *E. faecium* i były jednocześnie oporne na wankomycynę i teikoplaninę. Tylko co drugi izolat *E. faecalis* i co czwarty izolat *E. faecium* był wrażliwy na wysokie stężenie gentamycyny (tabela V).

Najczęstszym punktem wyjścia bakteriemii enterokokokowej jest przewód pokarmowy. W badaniach własnych stanowił on źródło enterokoków u ponad połowy pacjentów z bakteriemią wywołaną przez te drobnoustroje. Byli to chorzy z neutropenią, ostrą biegunką i zapaleniem błony śluzowej przewodu pokarmowego, jako ubocznymi skutkami leczenia chorób hematologicznych i immunosupresji po przeszczepach szpiku kostnego.

Drugim ważnym źródłem zakażenia krwi enterokokami był zakażony układ moczowy. Bakteriemie wychodzące z tego układu stanowiły ok. 20% całkowitej liczby bakteriemii enterokokowych. W grupie tej dominowali pacjenci z chorobami nerek, w tym chorzy po przeszczepach. Szczególną grupą zwiększonego ryzyka wystąpienia zakażenia enterokokowego krwi, w tym szczepami VRE, są chorzy dializowani otrzewnowo. U tych pacjentów często obserwuje się nosicielstwo wankomycyno-opornych enterokoków w przewodzie pokarmowym.

Tabela V
Wrażliwość enterokoków izolowanych z krwi od pacjentów ACK na antybiotyki

Gatunek	Liczba izolatów	Odsetek izolatów wrażliwych na antybiotyki				
		Ampicylina	Wankomycyna	Teikoplanina	Linezolid	Gentamycyna*
E. faecalis	101	100,0%	98,24%	98,24%	100%	48,65%
E. faecium	217	0,00%	52, 45%	56,65%	98,15%	24,85%

* – wysokie stężenie antybiotyku

Wrażliwość na antybiotyki izolatów należących do dwóch dominujących gatunków jest bardzo zróżnicowana. W szczególności dotyczy to antybiotyków z grupy penicylin i glikopeptydów. Wszystkie izolaty *E. faecalis* z krwi pacjentów ACK były wrażliwe na antybiotyki z grupy penicylin (penicylina, ampicylina) natomiast wszystkie izolaty *E. faecium* były oporne. Tylko 2 spośród 101 izolatów *E. faecalis* były oporne

Zakażenia w obrębie skóry, tkanki mięśniowej oraz jamy brzusznej są częstym źródłem bakteriemii enterokokowych u pacjentów oddziałów chirurgicznych. Stanowiły one punkt wyjścia ok.10% rozpoznanych przypadków bakteriemii wywołanych przez enterokoki. Bakteriemie enterokokowe, gdzie źródłem drobnoustrojów były zakażone cewniki naczyniowe stanowiły tylko kilka procent tych zakażeń (tabela VI).

Tabela VI
Źródła zakażenia krwi enterokokami

Źródło zakażenia krwi	Liczba przypadków	Odsetki
Układ pokarmowy	164	51,25%
Układ moczowy	68	21,25%
Zakażone tkanki miękkie	28	8,75%
Cewniki naczyniowe	12	3,75%
Nieokreślone	48	15,00%
Razem	320	100%

6. Podsumowanie

Enterokoki, drobnoustroje o stosunkowo małej zjadliwości, powszechnie występujące w organizmie człowieka jako jeden z istotnych składników flory jelitowej są od dawna znanym czynnikiem etiologicznym zakażeń o różnej lokalizacji. W przeszłości jedynym poważnym z zakażeniem wywoływanym przez te drobnoustroje było zapalenie wsierdzia. Wprowadzenie penicyliny a następnie streptomycyny, umożliwiło skuteczne leczenie enterokokowego zapalenia wsierdzia wywoływanego w około 95% przypadków przez gatunek *E. faecalis*. Drobnoustrój ten był wrażliwy na penicyliny i wysokie stężenia aminoglikozydów, co umożliwiało zastosowanie skojarzonej antybiotykoterapii gwarantującej większą skuteczność leczenia. Wzrost znaczenia enterokoków jako drobnoustrojów wywołujących zakażenia krwi wiąże się z kilkoma procesami. Pierwszym był wzrost oporności enterokoków na wysokie stężenia aminoglikozydów, co przyczyniło się do pogorszenia skuteczności tradycyjnej terapii, polegającej na jednoczesnym podawaniu penicyliny i aminoglikozydu. Powszechne stosowanie tych antybiotyków w leczeniu zakażeń występowało w latach sześćdziesiątych, siedemdziesiątych i na początku lat osiemdziesiątych. Wprowadzenie do lecznictwa antybiotyków z grupy cefalosporyn i szerokie ich stosowanie od początku lat osiemdziesiątych w lecznictwie ambulatoryjnym i szpitalnym przyczyniło się do dominacji enterokoków w tlenowej florze jelitowej pacjentów otrzymujących te antybiotyki. W tym samym czasie rosła również liczba pacjentów z obniżoną odpornością, co wiąże się z postępem w leczeniu chorób hematologicznych i onkologicznych oraz rozwojem transplantologii. W efekcie doszło do wzrostu ryzyka wystąpienia bakteriemii enterokokowej w tych grupach chorych leczonych w szpitalach. Kolejnym zjawiskiem, które przyczyniło się do wzrostu roli enterokoków był wybuch w szpitalach epidemii zakażeń wywoływanych przez MRSA i szerokie wprowadzenie do lecznictwa wankomycyny. Antybiotyk ten stanowi lek drugiego rzutu w leczeniu zakażeń wywołanych przez enterokoki oporne na penicyliny i aminoglikozydy. Powszechne stosowanie wankomycyny do leczenia zakażeń i w profilaktyce okołooperacyjnej przyczyniło się do wyselekcjonowania na początku lat osiemdziesiątych enterokoków opornych na wankomycynę. W ciągu następnych 15 lat rozprzestrzeniły się one w szpitalach na całym świecie.

Był to kolejny krok prowadzący do wzrostu znaczenia tych bakterii w wywoływaniu różnych zakażeń, w tym zakażeń krwi. Kolejnym ważnym etapem było wprowadzenie do lecznictwa imipenemu. Antybiotyk ten wykazuje aktywność wobec szczepów *E. faecalis* ale nie obejmuje swoim spektrum szczepów *E. faecium*. W efekcie, u pacjentów leczonych imipenemem w uprzywilejowanej pozycji znajdują się szczepy *E. faecium* i to one dominują w tlenowej florze jelitowej tych chorych. Wzrost liczby chorych z dominującym we florze jelitowej gatunkiem *E. faecium*, którego szczepy są naturalnie znacznie bardziej oporne na antybiotyki niż *E. faecalis* stanowi kolejny czynnik ryzyka wystąpienia enterokokowego zakażenia krwi.

Z analizy danych przedstawionych w tym opracowaniu wynika, że najwięcej enterokokowych zakażeń krwi w ACK występuje u pacjentów Kliniki Hematologii Dorosłych. W związku z chorobą podstawową, chorzy ci otrzymują szereg chemioterapeutyków prowadzących do znacznego obniżenia odporności. Aby zapobiec zakażeniom otrzymują również profilaktycznie antybiotyki. Często stosowanymi w tym celu są cefalosporyny trzeciej generacji (np. ceftazydym), karbapenemy (np. imipenem) i glikopeptydy (np. wankomycyna). Taka terapia antybiotykowa, eliminująca szczególnie Gram-ujemne pałeczki jelitowe, przyczynia się do selektywnego namnażania enterokoków we florze jelita. W następnym etapie, u pacjentów otrzymujących imipenem, dochodzi do namnażania się szczepów *E. faecium*. Z kolei podawanie wankomycyny selekcjonuje w obrębie tego gatunku szczepy VRE. Proces selekcji drobnoustrojów opornych na antybiotyki, takich jak enterokoki oporne na wankomycynę, u pacjentów z wysokim ryzykiem wystąpienia zakażenia krwi (zły stan ogólny, znaczne osłabienie odporności) przyczynił się do znacznego wzrostu liczby przypadków zakażeń krwi wywołanych przez enterokoki. Dotyczy to głównie pacjentów leczonych w oddziałach hematologicznych, onkologicznych, transplantologicznych oraz oddziałach intensywnej terapii.

Piśmiennictwo

1. Bates J., Jordens J.Z., Griffithis D.T.: Farm animals as putative reservoir for vancomycin-resistant enterococal infection in man. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 781–785 (1995)
2. Coque T.M., Tomayko J.F., Ricke S.C., Okhyusen P.C., Murray B.E.: Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial,

community, and animal sources in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2605–2609 (1996)
3. Coudron P.E., Mayhall C.G.: *Streptococcus faecium* outbrek in a neonatel intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 1044–1048 (1984)
4. Facklam R.R., Sham D.F., Teixeira L.M.: Manual of Clinical Microbiology. ASM Press Washington D.C., USA, 1999
5. Facklam R.R., Teixeira L.M.: Clinical and Pathogenic Microbiology. ASM Press Washington D.C., USA, 1998
6. Gullberg R.M., Homann S.R., Phaier J.P. Enterococcal bacteremia: analysis of 75 episodes. *Rev. Infect. Dis*. **11**, 74–85 (1989)
7. Hammerum A.M., Fussing V., Aarestrup F.M., Wegener H.C.: Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by riboprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 677–680 (2000)
8. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Boltimore, 1994
9. Hryniewicz W., Zaręba T., Kawalec M.:Susceptibility patterns of *Enterococcus* spp. isolated in Poland during 1996. *J. Antimicrob. Agents*, **10**, 303–307 (1998)
10. Jett B.D., Hucke M.M., Gilmore M.S.: Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 462–478 (1994)
11. Lancefield R.C.: Serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**, 571–595 (1933)
12. Lambert H.P., O'Grady F.W.: Antybiotyki i chemioterapia. Wyd. Medyczne, Warszawa, 1994
13. Łękowska-Kochaniak A.E.: Enterokoki (paciorkowce kałowe) – probiotyki czy patogeny. *Post. Mikrobiol*. **4**, 341–361 (2000)
14. Murray B.E., Lapardo H.A.: Intrahospital spread of a single gentamicin-resistant, β-lactamase producing strain of *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 230–232 (1992)
15. Ricaurte J.C., Boucher H.W., Turett G.S., Moellering R.C., LaBombardi V.J., Kislak J.: Chloramphenicol treatment for Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clin. Microbiol. Infect.* **7,** 17–21 (2000)
16. Stosor V., Peterson L.R., Postelnick M., Noskin G.A.: *Enterococcus faecium* bacteremia. *Arch. Intenia. Med.* **158**, 522–527 (1998)
17. Timmers G.J., Van Der Zwet W.C. Simoons-Smit I.M., Savelkoul P.H.M., Meester H.H.M., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E.: Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a haematology unit: risk factor assessment and successful control of the epidemic. *Br. J. Hematol*. **116**, 826–833 (1998)
18. Wade J.J.: *Enterococcus faecium* in Hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**, 113–119 (1997)
19. Wieczyńska J., Kamińska W., Dzierżanowska D.: Enterokoki – patogeny XXI wieku. *Post Mikrobiol.* **3**, 257–278 (2001)
20. Witte W., Wirth R., Klare I.: Enterococci. *Chemotherapy*, **45**, 135–145 (1999)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 345–352
http://www.pm.microbiology.pl

ZNACZENIE KLINICZNE BAKTERII Z RODZAJU *ACINETOBACTER* – NOWE ZAGROŻENIA

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Marta Wróblewska

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, tel. (22) 622 00 28, e-mail: wroblewska@ib.amwaw.edu.pl

1. Wstęp. 2. Znaczenie kliniczne bakterii z rodzaju *Acinetobacter*. 3. Oporność pałeczek *Acinetobacter* spp. na antybiotyki. 4. Epidemiologia zakażeń wywoływanych przez *Acinetobacter* spp. 5. Kontrola zakażeń szpitalnych. 6. Wytwarzanie biofilmów przez *Acinetobacter* spp. 7. Podsumowanie

Clinical significance of *Acinetobacter* spp. – emerging problems

Abstract: *Acinetobacter* spp., particularly *A. baumannii*, are opportunistic microorganisms, causing infections most often in patients undergoing intensive therapy and in immunocompromised individuals. In the recent years, their clinical significance has been increasing. Due to the wide distribution of *Acinetobacter* spp. rods in the environment, as well as their ability to survive in different conditions, they may cause extensive and prolonged difficulties in to controling the epidemic outbreaks in healthcare institutions. Molecular techniques used for typing of bacterial isolates confirm their spread and show their ability to cause recurrent epidemics even several months after the first outbreak. To date, three epidemic clones of *A. baumannii* have been identified in Europe. Recently, it has been reported that isolates genetically identical to the European clone I and II are circulating in Poland.

Bacteria of the genus *Acinetobacter* are characterised by natural resistance to many antibacterial agents. They also easily acquire genes conferring resistance to other groups of antimicrobials, including carbapenems. Recently, the presence of a gene encoding metallo-β-lactamase type VIM has been detected in carbapenem-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated in Warsaw. This was the first report in Poland, while the presence of VIM enzymes in *A. baumannii* has been reported so far only in South Korea, Spain and Greece. Detection of bla_{VIM} gene in *A. baumannii* strains belonging to the European clone II, with the increased potential for epidemic spread, indicates the need to take effective measures which would prevent the spread of infections and would limit the selection of multidrug-resistant strains.

Formation of a biofilm by microorganisms is now increasingly recognized as their virulence factor contributing to the pathogenesis of infections. It is estimated that over 60% of all bacterial infections are caused by biofilms, including infections derived from the use of medical devices, such as central and peripheral vascular catheters, urinary catheters or implants. A wide variation in biofilm formation was detected among the clinical strains of *A. baumannii*.

1. Introduction. 2. Clinical significance of bacteria of the genus *Acinetobacter*. 3. Resistance of *Acinetobacter* rods to antibiotics. 4. Epidemiology of *Acinetobacter* spp. infections. 5. Control of nosocomial infections. 6. Formation of biofilms by *Acinetobacter* spp. 7. Summary

Słowa kluczowe: *Acinetobacter*, oporność na karbapenemy, metalo-β-laktamazy (MBL) typu VIM, biofilmy
Key words: *Acinetobacter*, carbapenem resistance, VIM-type metallo-β-lactamases (MBL), biofilms

1. Wstęp

Pałeczki z rodzaju *Acinetobacter* zalicza się – obok drobnoustrojów takich jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Burkholderia cepacia* – do grupy tak zwanych Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących. Bakterie te występują powszechnie w środowisku – w glebie, wodach powierzchniowych i ściekach [6, 37]. Mogą być również wykrywane u roślin i zwierząt oraz w produktach spożywczych. W środowisku szpitalnym występują głównie w miejscach wilgotnych – umywalkach, nawilżaczach powietrza, ssakach, rurach respiratorów, itp., jak również w wodzie wodociągowej. Mogą skażać powierzchnie, na których przeżywają nawet przez kilka tygodni lub miesięcy [41, 67]. Mimo iż bakterie te z reguły występują w środowisku wilgotnym, obecnie coraz częściej podkreśla się ich zdolność do przetrwania także w środowisku suchym, co zwiększa ich potencjał do wywoływania zakażeń szpitalnych.

Klasyfikacja gatunków w obrębie rodzaju *Acinetobacter* nadal nie jest jeszcze dokładnie ustalona i podlega ciągłym zmianom [9, 18]. Aktualnie wyróżnia się co najmniej 33 gatunki zidentyfikowane genetycznie – tzw. genogatunki (ang. genomic species) [18]. Klasyfikację rodzaju *Acinetobacter* komplikuje powstanie dwóch odrębnych systemów nazewnictwa tych bakterii – B o u v e t a i J e a n j e a n oraz T j e r n b e r g i U r s i n g a [9]. Obecnie trwają prace nad ustaleniem podobieństwa bądź identyczności poszczególnych gatunków, objętych tymi dwoma systemami taksonomicznymi. Oprócz uznanych 33 genogatunków, na podstawie badań molekularnych wyodrębniono dodatkowo 31 grup izolatów [18]. W praktyce klinicznej największe znaczenie mają szczepy należące do gatunku *A. baumannii* (dawniej: *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*), którego aktualną nazwę zatwierdzono w 1986 r. [9].

Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* charakteryzują się wieloma czynnikami, które warunkują ich zjadliwość

oraz ułatwiają kolonizację lub infekcję pacjentów poddawanych zabiegom diagnostycznym i leczniczym. Mało jednak wiadomo na temat genów i czynników odgrywających rolę w ich podstawowej fizjologii. Istnieją doniesienia, że alkohol może stanowić jedyne źródło węgla dla tych bakterii i zwiększa ich wirulencję [2, 49]. Podważyłoby to zasadność stosowania środków do dezynfekcji rąk na bazie alkoholu, co stanowi obecnie podstawę profilaktyki zakażeń szpitalnych.

2. Znaczenie kliniczne bakterii z rodzaju *Acinetobacter*

Pałeczki niefermentujące stanowią coraz większe zagrożenie dla osób poddawanych intensywnej terapii [6, 40, 66, 73]. Szczepy *Acinetobacter* spp. mogą stanowić 10–13% ogółu bakterii izolowanych od hospitalizowanych pacjentów [37]. Śmiertelność związana z tymi zakażeniami jest duża i sięga 30–80% [33, 36].

Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* są ważnymi czynnikami etiologicznymi zapaleń płuc związanych ze stosowaniem respiratora (ang. ventilator-associated pneumonia, VAP) [6, 46, 63, 70]. Kolonizują otwarte rany i rurki tracheostomijne, jak również odgrywają rolę w zakażeniach układu moczowego, zakażeniach krwi, infekcjach skóry i tkanek miękkich, zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych, bakteryjnym zapaleniu wsierdzia oraz zakażeniach oczu [6, 36, 46, 47, 63, 70]. W ostatnich latach notuje się coraz więcej zakażeń *Acinetobacter* spp. u hospitalizowanych dzieci [33]. Bakterie te rzadko wywołują zakażenia pozaszpitalne, lecz mogą one mieć ciężki przebieg [37, 38].

Największą rolę w praktyce klinicznej odgrywa gatunek *A. baumannii*, stanowiący 70–90% klinicznych izolatów z rodzaju *Acinetobacter* [6, 37]. U pacjentów hospitalizowanych na OIT powoduje on najczęściej VAP (25– 49% przypadków), zakażenia krwi i linii naczyniowych (27–38%), zakażenia układu moczowego (19–22%) oraz infekcje ran (16–32%) [6, 37]. Stosunkowo często od hospitalizowanych pacjentów izoluje się też szczepy *A. lwoffii*, *A. johnsonii* i *A. haemolyticus* [37]. Postacie kliniczne zakażeń wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Acinetobacter* przedstawiono w tabeli I.

Zakażenia układu oddechowego stanowią najczęstszy rodzaj infekcji wywołanych przez szczepy *Acinetobacter* spp., zwłaszcza u pacjentów hospitalizowanych na OIT [6, 32, 33, 71]. Szacuje się, że 3–10% szpitalnych zapaleń płuc jest wywołanych przez *Acinetobacter* spp., a w grupie pacjentów wentylowanych za pomocą respiratora odsetek ten wynosi nawet 10–27% [33, 34]. Ogółem śmiertelność (ang. crude mortality) w przebiegu zakażeń układu oddechowego wywołanych przez *Acinetobacter* spp. waha się od 30 do 75% i jest największa w grupie pacjentów z VAP. Pojawiło się też doniesienie o rosnącej roli bakterii z rodzaju *Acinetobacter* w wywoływaniu pozaszpitalnego zapalenia płuc, o ciężkim przebiegu klinicznym i obarczonego dużą śmiertelnością, co może stanowić nowy zespół chorobowy [38]. Zakażenia układu oddechowego o etiologii *Acinetobacter* spp., wywołane przez szczepy wielolekooporne, stwierdzono też u osób, które przeżyły tsunami [25].

Zakażenia krwi są ważną postacią infekcji wywoływanych przez szczepy *Acinetobacter* spp. [46]. Według wieloośrodkowych badań w USA i Europie *Acinetobacter* spp. zaliczony został do 10 najczęstszych patogenów zakażeń krwi [24, 45]. Częstość izolacji *Acinetobacter* spp. w szpitalnych zakażeniach krwi wynosi 1–10% ogółu szczepów [13, 37, 69]. Ponad 70% szpitalnych zakażeń krwi o etiologii *Acinetobacter* spp. występuje na OIT [13]. Bakterie te mogą powodować sepsę, prowadzącą w 25–30% przypadków do wstrząsu septycznego [13, 33, 37]. Mogą też być czynnikiem etiologicznym bakteryjnego zapalenia wsierdzia, rozwijającego się po leczeniu stomatologicznym lub po zabiegach kardiochirurgicznych [31, 42]. Ostatnio zwrócono uwagę na dużą częstość występowania bakteriemii spowodowanej przez *Acinetobacter* spp. wśród żołnierzy rannych w Iraku i w Afganistanie [35, 48]. Znaczna część tych szczepów charakteryzuje się opornością na wiele grup leków, a ponad 60% szczepów wykazuje podobieństwo genetyczne do trzech klonów dominujących w Europie.

Częstą postać infekcji wywoływanych przez szczepy *Acinetobacter* spp. stanowią zakażenia ran i skóry [37]. W ciągu ostatnich 10 lat zanotowano znaczny wzrost udziału tych bakterii w etiologii infekcji skóry i tkanek miękkich z 25% do 45%. Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* szczególnie często kolonizują lub zakażają rany operacyjne u hospitalizowanych pacjentów, co może prowadzić do bakteriemii [33]. Są też ważnymi czynnikami etiologicznymi zakażeń ran oparzeniowych (zwłaszcza rozległych) oraz odleżyn [37, 41]. Zaobserwowano również częste występowanie tych bakterii w zakażeniach ran u żołnierzy w Iraku, prawdopodobnie wskutek skażenia ran ziemią [35, 48]. Wielolekooporne szczepy tych bakterii wyizolowano również z zakażonych ran u osób, które przeżyły tsunami [25].

Częstość szpitalnych zakażeń układu moczowego, wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Acinetobacter*, waha się od 2% do ponad 60% [6, 37]. Infekcje te najczęściej występują u osób w podeszłym wieku, z innymi współistniejącymi schorzeniami, u leczonych na OIT oraz z założonymi na stałe cewnikami moczowymi. Niedawno zakażenie układu moczowego wywołane przez wielolekooporny szczep *A. baumannii* stwierdzono u pacjentki z urazem pęcherza moczowego wskutek tsunami [25].

Tabela I

Postacie kliniczne zakażeń wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Acinetobacter*

Układ/narząd	Rodzaj zakażenia/postać kliniczna
układ oddechowy	• szpitalne zapalenie płuc (w tym respiratorowe zapalenie płuc) • pozaszpitalne zapalenie płuc
układ krążenia	• bakteriemia • bakteryjne zapalenie wsierdzia (po zabiegach kardiochirurgicznych, stomatologicznych) • sepsa
skóra i tkanka podskórna	• zakażenia ran pooperacyjnych • zakażenia ran oparzeniowych • zakażenia ran u żołnierzy • zakażenia ran u osób, które przeżyły tsunami
układ moczowy	• zakażenie układu moczowego u osób z cewnikiem moczowym • pourazowe zakażenie układu moczowego
układ nerwowy	• zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych po zabiegach neurochirurgicznych • pourazowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych • zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych związane z obecnością układu zastawkowego do drenażu komorowego
układ pokarmowy i jama brzuszna	• zapalenie dróg żółciowych • zapalenie otrzewnej
oko	• zapalenie spojówek • pourazowe zakażenia oka • zakażenia oka po zabiegach okulistycznych • zakażenia przeszczepionej rogówki • zakażenia oka u osób noszących soczewki kontaktowe
inne	zakażenia ucha ropień tarczycy zakażenia po zabiegach stomatologicznych

Acinetobacter spp. uważane są za ważne czynniki etiologiczne szpitalnych zakażeń ośrodkowego układu nerwowego [6, 23, 63, 72]. Śmiertelność w przypadkach zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych wywołanych przez *Acinetobacter* spp. jest szacowana na 20–27% [6, 23]. Bakterie te mogą powodować nawracające epidemie w oddziale szpitalnym, co wymaga ciągłego ścisłego przestrzegania zasad kontroli zakażeń [71, 72].

Szczepy z rodzaju *Acinetobacter* izolowano w przypadkach zapalenia spojówek, zakażenia oka po urazie lub po zabiegach okulistycznych, infekcji przeszczepionej rogówki lub zakażenia oka u osób noszących soczewki kontaktowe [14, 30]. Bakterie te izolowane są z przewodów wodnych w unitach dentystycznych oraz ze sprzętu stosowanego w pracowniach protetycznych, co może przyczyniać się do zakażeń u osób z zaburzeniami odporności, poddawanych zabiegom stomatologicznym [43, 74].

3. Oporność pałeczek *Acinetobacter* spp. na antybiotyki

Bakterie *Acinetobacter* spp. charakteryzują się naturalną opornością na wiele leków (ampicylina, amoksycylina, cefalosporyny pierwszej generacji), a w miarę upływu lat nabyły oporność na kolejne ich grupy. Obecnie notuje się szybki wzrost częstości występowania wielolekoopornych (ang. multidrug-resistant, MDR) szczepów z rodzaju *Acinetobacter*, w tym opornych na karbapenemy, co sprawia, że możliwości leczenia stają się coraz bardziej ograniczone [1, 3, 36, 40, 47, 60]. Ostatnio coraz częściej od hospitalizowanych pacjentów izoluje się szczepy wrażliwe tylko na sulbaktam i kolistynę [29, 40, 60].

W obrębie rodzaju *Acinetobacter* wykryto kilka mechanizmów oporności na leki β-laktamowe o szerokim spektrum, takie jak zmiany w obrębie białek wiążących penicyliny (ang. penicillin binding protein, PBP) lub zmniejszona przepuszczalność błony zewnętrznej wskutek utraty białek porynowych [8, 21, 78]. Najczęściej występującym mechanizmem jest jednak obecność β-laktamaz kodowanych przez geny znajdujące się w obrębie chromosomów lub na plazmidach [6, 8, 21, 78]. Kumulacja kilku mechanizmów prowadzi do powstania szczepów MDR, a nawet opornych na wszystkie dostępne leki przeciwdrobnoustrojowe – PDR (ang. pandrug-resistant) [8, 34, 66].

Oporność na karbapenemy najczęściej spowodowana jest wytwarzaniem przez bakterie enzymów hydrolizujących te leki, zwanych karbapenemazami [44, 60]. Należy do nich większość metalo-β-laktamaz – MBL (klasa B według klasyfikacji Amblera) oraz niektóre

β-laktamazy klasy A i D [44, 65]. Szczepy *A. baumannii* wytwarzają też cefalosporynazę AmpC o słabej aktywności karbapenemazy [15]. Inne mechanizmy oporności na tę grupę antybiotyków to zmniejszone powinowactwo białek wiążących penicylinę (PBP) do karbapenemów, zwiększone usuwanie/wypompowywanie antybiotyków β-laktamowych z komórki bakteryjnej wskutek nadmiernej aktywacji pomp błonowych, zmniejszona przepuszczalność błony zewnętrznej wywołana defektami białek porynowych, jak również jednoczesne występowanie zmniejszonej przepuszczalności i wysokiego poziomu wytwarzania β-laktamazy, zwłaszcza typu AmpC [3, 21, 44, 65]. W Europie wśród izolatów *Acinetobacter* spp. opornych na karbapenemy dominują szczepy wytwarzające metalo-β-laktamazy typu IMP oraz karbapenemazy typu OXA [44, 65].

Wytwarzanie enzymów MBL typu VIM przez szczepy *Acinetobacter* spp. jest rzadkością. Obecność genu kodującego enzymy typu VIM-2 stwierdzono w Niemczech u szczepu z rodzaju *Acinetobacter* należącego do genogatunku 14TU oraz w Polsce u jednego szczepu sklasyfikowanego jako genogatunek 3 [22, 56]. Jednak występowanie MBL typu VIM u szczepów *A. baumannii*, gatunku odgrywającego największą rolę w medycynie, opisano dotąd tylko w kilku krajach – w Korei Południowej, w Hiszpanii, w Grecji i w Polsce [11, 59, 76, 77]. Wytwarzanie tych enzymów przez szczepy *A. baumannii*, mające potencjał epidemiczny, stanowi bardzo duże zagrożenie dla pacjentów (zwłaszcza hospitalizowanych na OIT) i znaczne ograniczenie możliwości terapeutycznych.

4. Epidemiologia zakażeń wywoływanych przez *Acinetobacter* spp.

Badania molekularne epidemicznych szczepów *A. baumannii* pozwoliły na zidentyfikowanie trzech dominujących w Europie klonów – I, II i III [17, 61]. Wywołują one trudne do kontroli ogniska epidemiczne i mogą przetrwać w szpitalu endemicznie. Klony I i II były odpowiedzialne za ogniska epidemiczne w północno-zachodniej Europie [17, 18, 61]. Europejski klon III zarejestrowano we Francji, Hiszpanii, Włoszech, Belgii i Holandii [61]. W literaturze istniała wzmianka o występowaniu klonu I i II także w Polsce na podstawie jednego izolatu z każdej grupy, brak jednak było analizy tego zjawiska [61]. Ostatnio opisano występowanie szczepów *A. baumannii*, reprezentujących te klony, w szpitalach klinicznych w Warszawie [76]. Stwierdzenie występowania genu bla_{VIM} u szczepów zaliczanych do europejskiego klonu II, o wzmożonym potencjale epidemicznym, wskazuje na konieczność podjęcia skutecznych działań zapobiegających zakażeniom oraz ograniczenia selekcji szczepów wielolekoopornych.

Acinetobacter spp., w przeciwieństwie do innych pałeczek Gram-ujemnych, często występują na skórze zdrowych osób, stanowiąc fizjologiczną florę osiadłą [7]. Bakterie te mogą występować na skórze około 25% zdrowych osób, w niektórych regionach geograficznych częściej niż w innych [7, 57]. U osób zdrowych dominują gatunki inne niż *A. baumannii*. W przeciwieństwie do tego, w warunkach szpitalnych, zwłaszcza w ognisku epidemicznym, bardzo często stwierdza się występowanie *A. baumannii* na skórze zarówno pacjentów, jak i personelu medycznego [33]. U hospitalizowanych pacjentów nosicielstwo *Acinetobacter* spp. na skórze może dotyczyć nawet jednej trzeciej chorych i zwiększa się podczas pobytu w szpitalu. Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* szczególnie często kolonizują rany oparzeniowe – nawet u ponad 50% pacjentów [33].

Nosicielstwo *Acinetobacter* spp. w jamie ustnej lub w górnych drogach oddechowych występuje rzadko u osób zdrowych, w przeciwieństwie do hospitalizowanych pacjentów, u których pałeczki te mogą również kolonizować układ pokarmowy i pochwę [6, 13, 55, 57]. Kolonizacja pacjentów, zwłaszcza leczonych na OIT, sprzyja skażeniu rąk personelu medycznego i środowiska szpitalnego [55, 57]. Wskazuje to na konieczność ścisłego przestrzegania higieny rąk podczas opieki nad pacjentami [7, 29, 60, 66].

Pałeczki *Acinetobacter* spp. szczególnie często występują w środowisku wilgotnym, obecnie jednak podkreśla się, że szczepy tych bakterii mogą przeżyć przez dłuższy okres czasu nawet na suchych powierzchniach i w powietrzu [4, 6, 27, 67]. Skażenie powierzchni i powietrza jest szczególnie duże, gdy na sali przebywa pacjent skolonizowany lub zakażony *Acinetobacter* spp. [4, 23, 33]. Należy zwrócić uwagę, iż skażenie powietrza może odgrywać znacznie większą rolę w szerzeniu się bakterii *Acinetobacter* spp. w środowisku szpitalnym niż dotychczas uważano [4, 26, 54]. Pałeczki z rodzaju *Acinetobacter*, oprócz minimalnych wymagań odżywczych, wykazują zdolność przeżycia w szerokim zakresie temperatur i pH. Udokumentowano utrzymywanie się skażenia środowiska szpitalnego pałeczkami *Acinetobacter* spp. nawet przez wiele dni po wypisaniu pacjenta [6]. Bakterie te mogą pozostać żywotne w suchym środowisku przez okres kilku tygodni lub miesięcy, a nawet do roku (tabela II) [27, 64, 67]. Wspomniane wcześniej doniesienia o zdolności *A. baumannii* do wykorzystywania etanolu jako źródła węgla, potrzebnego na namnażania się bakterii, może stanowić duży problem w zakresie kontroli zakażeń szpitalnych, ponieważ obecnie do odkażania powierzchni i sprzętu medycznego powszechnie stosuje się preparaty dezynfekcyjne na bazie alkoholu etylowego.

Acinetobacter spp., zwłaszcza *A. baumannii*, z łatwością skażają też sprzęt medyczny, taki jak respira-

Tabela II
Przeżywalność szczepów *Acinetobacter* spp. na powierzchniach abiotycznych

Rodzaj powierzchni	Okres przeżycia
laminat	3–13 dni
sucha bibuła	6 dni
szkło	7 dni – 11 miesięcy
bawełna	9–25 dni
porcelana, PVC, stal, guma	kilka miesięcy
polietylen, poliuretan	>60 dni
fartuchy (bawełna/poliester)	>11 dni

tory, butle ssaków, worki resuscytacyjne typu Ambu, dializatory i aparatura do odsysania [23, 32, 60, 66]. Autoklawowanie i sterylizacja w tlenku etylenu inaktywują pałeczki *Acinetobacter,* lecz kliniczne izolaty tych bakterii mogą być oporne na promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe [12, 28, 32]. Należy też zwrócić szczególną uwagę na jakość wody stosowanej w opiece nad pacjentami, zwłaszcza w oddziałach intensywnej terapii [23].

5. Kontrola zakażeń szpitalnych

Szacuje się, że około połowa klinicznych izolatów *Acinetobacter* spp. to szczepy epidemiczne. Nabywanie przez te bakterie genów oporności na wiele leków przeciwbakteryjnych ogranicza w znacznym stopniu możliwości terapeutyczne w ognisku zakażeń, zaś sama kontrola zakażeń szpitalnych wywoływanych przez wielolekooporne szczepy jest kompleksowym zadaniem obejmującym wiele działań. Opisano przypadki importowania wielolekoopornych szczepów *A. baumannii* wskutek transferu pacjenta z OIT w kraju o dużej częstości występowania takich szczepów do innego kraju [58, 64]. Istnieje również obawa, iż wielolekooporne szczepy *Acinetobacter* spp. izolowane od żołnierzy rannych w Iraku, mogły być przeniesione do leczących tych pacjentów szpitali w USA, Wielkiej Brytanii i w Niemczech [35, 48]. Podkreśla się więc potrzebę badań skriningowych w kierunku wykrywania wielolekoopornych bakterii u pacjentów przyjmowanych z zagranicy, z OIT lub innych oddziałów [50, 58]. Szczepy *Acinetobacter* spp. mogą występować w szpitalach endemicznie, zwłaszcza na OIT [1, 26, 39, 63]. W przypadku przenoszenia pacjenta skolonizowanego lub zakażonego wielolekoopornym szczepem *A. baumannii* do innej placówki ochrony zdrowia, bardzo ważne jest poinformowanie tej instytucji o zagrożeniu.

W celu skutecznego opanowania ogniska epidemicznego w szpitalu należy stosować kompleksowy program działań w zakresie kontroli zakażeń, obejmujący izolację lub kohortowanie zakażonych lub skolonizowanych pacjentów, higienę rąk personelu, stosowanie jednorazowych rękawiczek i innych środków ochrony osobistej oraz właściwą dezynfekcję środowiska szpitalnego, jak również wprowadzenie racjonalnej polityki antybiotykowej i skuteczne leczenie zakażeń [29, 36, 60, 66].

6. Wytwarzanie biofilmów przez *Acinetobacter* spp.

Wytwarzanie biofilmów przez drobnoustroje wzbudza aktualnie ogromne zainteresowanie naukowców. Komórki bakteryjne występujące w obrębie biofilmu mogą być do 1000 razy bardziej oporne na antybiotyk niż ten sam drobnoustrój namnażający się w formie planktonowej [19, 51]. Obecnie szacuje się, że wytwarzanie biofilmu odgrywa istotną rolę w ponad 60% wszystkich zakażeń bakteryjnych, w tym w zakażeniach związanych ze stosowaniem tworzyw sztucznych w postaci centralnych i obwodowych cewników naczyniowych, cewników moczowych, układu zastawkowego do drenażu komorowego czy implantów [19, 68]. Przyleganie do powierzchni abiotycznych oraz wytwarzanie biofilmu przez bakterie i grzyby jest obecnie oceniane jako ważny czynnik wirulencji tych patogenów [5, 19, 20, 68].

Infekcje *Acinetobacter* spp. u hospitalizowanych pacjentów często poprzedzone są kolonizacją tym drobnoustrojem, zwłaszcza w odniesieniu do materiałów wszczepialnych [68]. Zdolność danego izolatu do wytwarzania biofilmu może mieć istotne znaczenie w ułatwianiu tym bakteriom kolonizacji, a następnie zakażenia pacjenta. Jednak istnieją tylko nieliczne doniesienia naukowe (w większości nieopublikowane) na temat wytwarzania biofilmu przez kliniczne szczepy *Acinetobacter* spp., izolowane od hospitalizowanych pacjentów [10, 16, 62, 75]. Obecność *Acinetobacter* spp. stwierdzono w biofilmach utworzonych na powierzchni cewników moczowych oraz w obrębie przewodów wodnych unitów stomatologicznych [52, 53]. Wytwarzanie biofilmu przez *A. baumannii* prawdopodobnie sprzyja przetrwaniu tej bakterii na powierzchniach w środowisku szpitalnym i chroni przed ewentualnym działaniem czynników przeciwbakteryjnych [62]. Może to mieć ogromne znaczenie w ograniczeniu skuteczności środków dezynfekcyjnych stosowanych w szpitalu.

7. Podsumowanie

Bakterie *Acinetobacter* spp., zwłaszcza *A. baumannii*, są drobnoustrojami oportunistycznymi, wywołującymi infekcje najczęściej u pacjentów poddawanych

intensywnej terapii oraz u chorych z zaburzeniami odporności. W ostatnich latach ich znaczenie kliniczne znacznie wzrosło. Ze względu na powszechne występowanie tych pałeczek w środowisku oraz zdolność do przeżywania w różnych warunkach, mogą one wywoływać w placówkach ochrony zdrowia rozległe i przedłużające się, trudne do wygaszenia ogniska epidemiczne. Zastosowanie technik molekularnych do typowania bakterii potwierdza ich szerzenie się, jak również zdolność do wywoływania nawracających epidemii nawet kilka miesięcy po wystąpieniu pierwszego ogniska. W Europie zidentyfikowano dotąd trzy klony epidemiczne *A. baumannii*. Niedawno opisano występowanie w Polsce izolatów tego gatunku identycznych genetycznie z europejskim klonem I i II.

Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* cechują się naturalną opornością na wiele leków przeciwbakteryjnych, jak również łatwym nabywaniem genów oporności na inne grupy, w tym na karbapenemy. Ostatnio, u opornych na karbapenemy szczepów *Acinetobacter baumannii*, wyizolowanych w Warszawie, wykazano obecność genu kodującego metalo-β-laktamazę typu VIM. Jest to pierwsze doniesienie w Polsce, a na świecie obecność tego typu enzymów u szczepów *A. baumannii* opisano dotąd tylko w Korei Południowej, Hiszpanii i Grecji. Stwierdzenie występowania genu bla_{VIM} u szczepów zaliczanych do europejskiego klonu II, o wzmożonym potencjale epidemicznym, wskazuje na konieczność podjęcia skutecznych działań zapobiegających zakażeniom oraz ograniczenia selekcji szczepów wielolekoopornych.

Zdolność drobnoustrojów do wytwarzania biofilmów jest w coraz większym stopniu uważana za ich czynnik wirulencji, istotny w patogenezie infekcji. Szacuje się, że biofilmy odgrywają rolę w ponad 60% wszystkich zakażeń bakteryjnych, włącznie z infekcjami związanymi ze stosowaniem centralnych i obwodowych cewników naczyniowych, cewników moczowych czy implantów. Wśród klinicznych szczepów *A. baumannii* stwierdzono duże zróżnicowanie zdolności do produkcji biofilmu.

Piśmiennictwo

1. Abbo A., Navon-Venezia S., Hammer-Muntz O., Krichali T., Siegman-Igra Y., Carmeli Y.: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 22–29 (2005)
2. Abbott B.J., Laskin A.I., McCoy C.J.: Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* on ethanol. *Appl. Microbiol.* **25**, 787–792 (1973)
3. Afzal-Shah M., Livermore D.M.: Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 576–577 (1998)
4. Allen K.D., Green H.T.: Hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter anitratus*. An airborne mode of spread? *J. Hosp. Infect.* **7**, 169–175 (1987)
5. Bartoszewicz M., Mączyńska B.: Tworzenie biofilmu przez gronkowce koagulazoujemne jako podstawa zakażeń związanych z biomateriałami. *Zakażenia*, **6**, 103–106 (2006)
6. Bergogne-Bérézin E, Towner K.J.: *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 148–165 (1996)
7. Berlau J., Aucken H., Malnick H., Pitt T.: Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 179–183 (1999)
8. Bonomo R.A., Szabo D.: Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* **43** (Suppl. 2), S49–S56 (2006)
9. Bouvet P.J., Grimont P.A.: Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 228–240 (1986)
10. Can F., Kurt Azap O., Demirbilek M., Timurkaynak F., Karabay G., Arslan H.: Biofilm formation of nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains. *15th Europ. Congress Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Copenhagen 2005. Abstract number 1134_03_420.
11. Canduela M.J., Gallego L., Sevillano E., Valderrey C., Calvo F., Perez J.: Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from elderly patients with respiratory tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 1220–1222 (2006)
12. Christensen E., Gerner-Smidt P., Kristensen H.: Radiation resistance of clinical *Acinetobacter* spp. A need for concern? *J. Hosp. Infect.* **18**, 85–92 (1991)
13. Cisneros J.M., Rodriguez-Bano J.: Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**, 687–693 (2002)
14. Corrigan K.M., Harmis N.Y., Willcox M.D.: Association of *Acinetobacter* species with contact lens-induced adverse responses. *Cornea*, **20**, 463–466 (2001)
15. Corvec S., Caroff N., Espaze E., Giraudeau C., Drugeon H., Reynaud A.: AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 629–635 (2003)
16. de Breij A., van Diemen L.J.G., van den Barselaar M.T., Bloemberg G.V., van den Broek P.J., Nibbering P.H., Dijkshoorn L.: Investigation into biofilm formation and interaction with human cells to explain the clinical role of *Acinetobacter baumannii* vs. other *Acinetobacter* spp. *7th Intern. Symp. Biology of Acinetobacter*, Barcelona 2006, Abstract O20
17. Dijkshoorn L., Aucken H., Gerner-Smidt P., Janssen P., Kaufmann M.E., Garaizar J., Ursing J., Pitt T.L.: Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1519–1525 (1996)
18. Dijkshoorn L., Vaneechoutte M., DeBaere T., van der Reijden T., Nemec A.: The diversity of the genus *Acinetobacter*, current state and emerging problems. *7th International Symposium on the Biology of Acinetobacter*, Barcelona, 2006 (Abstract P1).
19. Donlan R.M.: Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 277–281 (2001)
20. Dorocka-Bobkowska B., Konopka K.: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.* **40**, 405–410 (2003)

21. Fernandez-Cuenca F., Martinez-Martinez L., Conejo M.C., Ayala J.A., Perea E.J., Pascual A.: Relationship between β-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 565–574 (2003)
22. Fiett J., Baraniak A., Mrówka A., Fleischer M., Drulis-Kawa Z., Naumiuk L., Samet A., Hryniewicz W., Gniadkowski M.: Molecular epidemiology of acquired-metallo-β-lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 880–886 (2006)
23. Flaherty J.P., Stosor V.: Nonfermentative Gram-negative bacilli. (w:) Hospital epidemiology and infection control. red. C. Mayhall, Lippincott, Williams & Wilkins 2004, s. 575–602
24. Fluit A.C., Jones M.E., Schmitz F.-J., Acar J., Gupta R., Verhoef J., the SENTRY Participants Group.: Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 and 1998. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 454–460 (2000)
25. Garzoni C., Emonet S., Legout L., Benedict R., Hoffmeyer P., Bernard L., Garbino J.: Atypical infections in tsunami survivors. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1591–1593 (2005)
26. Gerner-Smidt P.: Endemic occurrence of *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **10**, 265–272 (1987)
27. Getchell-White S.J., Donowitz L.G., Groschel D.H.M.: The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **10**, 402–407 (1989)
28. Glauert A.M., Thornley M.J.: Fine structure and radiation resistance in *Acinetobacter*: a comparison of a range of strains. *J. Cell Sci.* **8**, 19–41 (1971)
29. Go E.S., Urban C., Burns J., Kreiswirth B., Eisner W., Mariano N., Mosinka-Snipas K., Rahal J.J.: Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet*, **344**, 1329–1332 (1994)
30. Gopal L., Rao M.K. i wsp.: Endophthalmitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus*. A profile. *Ind. J. Ophthalmol.* **52**, 173–174 (2004) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
31. Gradon D.J., Chapnick E.K., Lutwick L.I.: Infective endocarditis due to *Acinetobacter*: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 1145–1148 (1992)
32. Hartstein A.I., Rashad A.L., Liebler J.M., Actis L.A., Freeman J., Rourke J.W. Jr., Stibolt T.B., Tolmasky M.E., Ellis G.R., Crosa J.H.: Multiple intensive care unit outbreak of *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies *anitratus* respiratory infection and colonisation associated with contaminated, reusable ventilator circuits and resuscitation bags. *Am. J. Med.* **85**, 624–631 (1988)
33. Hawkey P.M., Bergogne-Berezin E.: *Acinetobacter* spp. (w:) Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2nd Edition. red. S H. Gillespie, P.M. Hawkey, John Wiley & Sons Ltd. 2006, s. 231–244
34. Hsueh P.-R., Teng L.-J., Chen C.-Y., Chen W.-H., Yu C.-J., Ho S.-W., Luh K.-T.: Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 827–832 (2002)
35. Hujer K. Bonomo R.A. i wsp.: Multi-drug resistant *Acinetobacter* isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center: analysis of antibiotic resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 4114–4123 (2006) (cotowana praca jest dziełem 18 autorów)
36. Jain R., Danziger L.H.: Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann. Pharmacother.* **38**, 1449–1459 (2004)
37. Lahiri K.K., Mani N.S., Purai S.S.: *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogen: clinical significance and antimicrobial sensitivity. *Med. J. Armed Forces India*, **60**, 7–10 (2004)
38. Leung W.-S., Chu C.-M., Tsang K.-Y., Lo F.-H., Lo K.-F., Ho P.-L.: Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest*, **129**, 102–109 (2006)
39. Manuel R.J., Shin G.Y., Farrag N., Holliman R.: Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter buamannii* in a London hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 141–142 (2003)
40. Navon-Venezia S., Ben-Ami R., Carmeli Y.: Update on *Pseudomonas seruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**, 306–313 (2005)
41. Neely A.N.: A survey of Gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. *J. Burn Care Rehabilit.* **21**, 523–527 (2000)
42. Olut A.I., Erkek E.: Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* **37**, 919–921 (2005)
43. Pankhurst C.L., Johnson N.W.: Microbial contamination of dental unit waterlines: the scientific argument. *Internat. Dent. J.* **48**, 359–368 (1998)
44. Poirel L., Nordmann P.: Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 826–836 (2006)
45. Raveh D., Rudensky B., Schlesinger Y., Benenson S., Yinnon A.M.: Susceptibility trends in bacteraemias: analyses of 7544 patient-unique bacteraemic episodes spanning 11 years (1990–2000). *J. Hosp. Infect.* **55**, 196–203 (2003)
46. Rubinstein E, Levy I.: *Acinetobacter* spp. and other nonfermentative pathogens causing nosocomial bacteremias. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**, 2S29–2S32 (1999)
47. Rupali J., Danziger L.H.: Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann. Pharmacother.* **38**, 1449–1459 (2004)
48. Scott P.T., Srinivasan A. i wsp.: *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U. S. service members, 2002–2004. *MMWR*; **53**, 1063–1066 (2004) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
49. Smith M.G., Des Etages S.G., Snyder M.: Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3874–3884 (2004)
50. Soothill J.S., Lock P.E.: Screening for carbapenem-resistant bacteria. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 597–598 (2005)
51. Stewart P.S.: Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Internat. J. Med. Microbiol.* **292**, 107–113 (2002)
52. Stickler D.J., King J., Nettleton J., Winters C.: The structure of urinary catheter encrusting bacterial biofilms. *Cells Mater.* **3**, 315–319 (1993)
53. Tall B.D., Williams H.N., George K.S., Gray R.T., Walch M.: Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. *Can. J. Microbiol.* **41**, 647–654 (1995)
54. Tang J. W., Li Y., Eames I., Chan P.K.S., Ridgway G.L.: Factors involved in the aerosol transmission of infection and control of ventilation in healthcare premises. *J. Hosp. Infect.* **64**, 100–114 (2006)
55. Timsit J.F., Garrait V., Misset B., Goldstein F.W., Renaud B., Carlet J.: The digestive tract is a major site for *Acinetobacter*

baumannii colonization in intensive care unit patients. *J. Infect. Dis.* **168**, 1336–1337 (1993)
56. Toleman M.A., Seifert H., Dijkshoorn L., Reinert R., Walsh T.: Hospital outbreak of an imipenem-resistant VIM-2 encoding *Acinetobacter* DNA group 14TU strain in a German teaching hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* **10** (suppl. 3), 48–49 (2004)
57. Towner K.J.: *Acinetobacter*. (w) Molecular Medical Microbiology. red. M. Sussman. Academic Press 2002; 987–998.
58. Towner K.J., Gee T., Boswell T.: An unwanted import to the UK: a carbapenem resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* producing metallo-β-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 1092–1093 (2002)
59. Tsakris A., Ikonomidis A., Pournaras S., Tzouvelekis L.S., Sofianou D., Legakis N.J., Maniatis A.N.: VIM-1 metallo-β-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 981–983 (2006)
60. Urban C., Segal-Maurer S., Rahal J.J.: Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 1268–1274 (2003)
61. van Dessel H., Dijkshoorn L., van der Reijden T., Bakker N., Paauw A., van den Broek P., Verhoef J., Brisse S.: Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res. Microbiol.* **155**, 105–112 (2004)
62. Vidal R., Dominguez M., Urrutia H., Bello H., Gonzalez G., Garcia A., Zemelman R.: Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios*, **86**, 49–58 (1996)
63. Villers D., Espaze E., Coste-Burel M., Giauffret F., Ninin E., Nicolas F., Richet H.: Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann. Intern. Med.* **129**, 182–198 (1998)
64. Wagenvoort J.H.T., Joosten E.J.: An outbreak of *Acinetobacter baumannii* that mimics MRSA in its environmental longevity. *J. Hosp. Infect.* **52**, 226–227 (2002)
65. Walther-Rasmussen J., Hoiby N.: OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 373–383 (2006)
66. Wang S.H., Sheng W.H., Chang Y.Y., Wang L.H., Lin H.C., Chen M.L., Pan H.J., Ko W. J., Chang S.C., Lin F.Y. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **53**, 97–102 (2003)
67. Wendt C., Dietze B., Dietz E., Ruden H.: Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1394–1397 (1997)
68. Wilson M.: Bacterial biofilms and human disease. *Sci. Progress*, **84**, 235–254 (2001)
69. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M., Seifert H., Wenzel R.P., Edmond M.B.: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 309–317 (2004)
70. Wróblewska M.: Bakterie z rodzaju *Acinetobacter*: znaczenie kliniczne i terapia zakażeń. *Pulmonol. Alergol. Pol.* **74** (2), 227–231 (2006)
71. Wróblewska M.: Epidemiologia i profilaktyka zakażeń szpitalnych wywoływanych przez bakterie *Acinetobacter* spp. *Zakażenia*, **5**, 77–82 (2005)
72. Wróblewska M.M., Dijkshoorn L., Marchel H., van den Barselaar M., Swoboda-Kopeć E., van den Broek P.J., Łuczak M.: Outbreak of nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii* in neurosurgical patients. *J. Hosp. Infect.* **57**, 300–307 (2004)
73. Wróblewska M., Marchel H., Rudnicka J., Łuczak M.: Częstość występowania i lekooporność niefermentujących pałeczek Gram-ujemnych izolowanych od pacjentów hospitalizowanych na oddziałach intensywnej terapii szpitala klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **57**, 217–224 (2005)
74. Wróblewska M., Piotrowska E.: Etiologia i epidemiologia zakażeń w praktyce stomatologicznej. (w:) Wybrane zagadnienia z mikrobiologii jamy ustnej. red. M. Łuczak, E. Swoboda-Kopeć. Wyd. Czelej, Lublin, 2004, s. 355–366.
75. Wroblewska M.M., Sawicka-Grzelak A., Marchel H., Luczak M., Sivan A.: Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**, 140–144 (2008)
76. Wróblewska M, Towner K.J., Marchel H., Łuczak M.: Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 490–496 (2007)
77. Yum J.H., Yi K., Lee H., Yong D., Lee K., Kim J.M., Rossolini G.M., Chong Y.: Mollecular characterization of metallo-β-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea; identification of two new integrons carrying the $bla_{\text{VIM-2}}$ gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 837–840 (2002)
78. Żmudziński A., Gospodarek E.: Mechanizmy oporności pałeczek *Acinetobacter* spp. na antybiotyki β-laktamowe. *Post. Mikrobiol.* **46**, 263–273 (2007)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 353–357
http://www.pm.microbiology.pl

ROLA BIOFILMÓW W PATOGENEZIE ZAKAŻEŃ CZŁOWIEKA

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Elżbieta Anna Trafny

Zakład Mikrobiologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii
ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa, tel/fax: (22) 685 32 06, e-mail: e.trafny@wihe.waw.pl

1. Wprowadzenie. 2. Zakażenia w otolaryngologii. 3. Zakażenia oskrzelowo-płucne u chorych na mukowiscydozę. 4. Zakażenia ran. 5. Podsumowanie

Biofilms and their role in infection pathogenesis

Abstract: The results of current studies do not explicitly confirm the role of biofilms in the pathogenesis of human infections. Instead, these results suggest an urgent need to study more closely the population structure of the pathogenic flora of the human skin and respiratory tract as well as the microbial and chemical composition of sessile populations using molecular and microscopic techniques. These studies could verify current views on biofilms and their role in chronic infectious diseases in humans.

1. Introduction. 2. Infections in otolaryngology. 3. Lung infections in cystic fibrosis patients. 4. Wound infections. 5. Conclusion

Słowa kluczowe: biofilmy, mikrokolonie, przewlekłe zakażenia
Key words: biofilms, microcolonies, chronic infections

1. Wprowadzenie

W kwietniu 2008 roku w bazie PubMed odnotowano ponad 8700 publikacji poświęconych biofilmom różnorodnych gatunków bakterii i grzybów. Znakomita większość tych prac prezentowała wyniki badań przeprowadzonych *in vitro*. Badania te potwierdzały, że na granicy faz (cieczy i powietrza, ciała stałego i powietrza oraz dwóch cieczy o różnych gęstościach) tworzą się biofilmy – skupiska drobnoustrojów, charakteryzujące się uporządkowaniem przestrzennym [21]. Drobnoustroje te wyrażają specyficzne cechy fenotypowe, takie jak tworzenie macierzy pozakomórkowej – EPS (*ang*. extracellular polymeric substances) oraz zwiększoną tolerancję na środki przeciwdrobnoustrojowe. Cechy te warunkują, przynajmniej *in vitro*, brak możliwości eradykacji tych drobnoustrojów za pomocą antybiotyków lub antymikotyków, nawet w bardzo wysokich stężeniach. Po zaprzestaniu stosowania środków bójczych liczba drobnoustrojów w biofilmach stosunkowo szybko powraca do wyjściowego poziomu.

Obserwacje te nasunęły skojarzenia z przewlekłymi i nawracającymi zakażeniami bakteryjnymi i grzybiczymi oraz nadały kierunek przyszłym badaniom, mającym na celu wykazanie udziału biofilmów w patogenezie chorób człowieka. Zadanie to okazało się stosunkowo proste w odniesieniu do zasiedlonych wszczepialnych biomateriałów: rozruszników, protez stawowych itp. Biomateriały te stanowiły, łatwe do identyfikacji, źródło groźnych nawracających zakażeń (nawet uogólnionych). Wymiana zasiedlonego biomateriału, połączona z agresywną antybiotykoterapią okołooperacyjną, skutkowała wyraźną poprawą stanu zdrowia chorego oraz najczęściej jego pełnym wyleczeniem. Na powierzchni usuniętych biomateriałów za pomocą technik mikroskopowych obserwowano biofilmy – mikrokolonie bakterii, otoczone EPS [20].

Dużo trudniejszym wyzwaniem okazało się wykazanie wzrostu drobnoustrojów w postaci biofilmów w zakażeniach bakteryjnych, grzybiczych lub mieszanych narządów i tkanek człowieka. Następujące kryteria zostały przyjęte dla zakwalifikowania danej jednostki chorobowej jako zakażenia przebiegającego z udziałem biofilmu: 1) zakażenie przebiega miejscowo; 2) drobnoustroje przylegają do powierzchni tworząc mikrokolonie, otoczone EPS; 3) zakażenie nie jest możliwe do wyleczenia przy użyciu środkow przeciwdrobnoustrojowych pomimo, że wyniki badań lekowrażliwości wskazują na wrażliwość bakterii i grzybów na stosowany antybiotyk lub antymikotyk [23]. Uzyskanie wyników świadczących o tym, że w tkankach drobnoustroje rosną w postaci mikrokolonii było trudne ze względu na brak dostępu do nowoczesnych technik obrazowania. Techniki te umożliwiają obserwacje biofilmów – trójwymiarowych struktur, w których woda stanowi od 75% do 90% masy. Spośród nowoczesnych technik obrazowania do badań biofilmów najczęściej wykorzystywana jest mikroskopia konfokalna (MK) wraz z metodą FISH (*ang*. fluorescent in situ hybridization) oraz mikroskopia sił atomowych [9]. Jednak nawet przy użyciu technik obrazowania nadal trudnym zadaniem jest jednoczesne uwidocznienie skupisk żywych bakterii i EPS w wycinkach tkanek, czyli spełnienie drugiego, z wymienionych powyżej kryteriów.

Należy podkreślić, że większość prac poświęconych badaniom osiadłych skupisk bakterii w zakażeniach

człowieka została opublikowana w ciągu ostatnich dwóch – trzech lat. Stąd metody badawcze są dalekie jeszcze od standaryzacji, a wyniki badań z różnych ośrodków – trudne do porównania. Jednakże wyniki tych badań są niezwykle interesujące a ich zestawienie może być pomocne w uzyskaniu odpowiedzi na pytanie: czy biofilmy odgrywają istotną rolę w rozwoju zakażeń człowieka?

2. Zakażenia w otolaryngologii

Do dnia dzisiejszego nie są znane patomechanizmy przewlekłego zapalenia ucha środkowego, migdałków, nosogardła i zatok. Analiza danych klinicznych dotyczących skuteczności terapii antybiotykowej w tych zakażeniach pokazała, że poprawa stanu klinicznego obserwowana jest jedynie u niewielkiego odsetka chorych. Posiewy np. treści z ucha środkowego są często ujemne, choć za pomocą technik molekularnych w wysięku wykrywana jest obecność bakteryjnego mRNA, wskazująca na obecność żywych bakterii. Obserwacje te stanowiły przesłanki dla podjęcia badań roli biofilmów w patogenezie tych zakażeń.

Pierwsze przesłanki wskazujące na wzrost nietypowalnych pałeczek *Haemophilus influenzae* w postaci biofilmu uzyskano po obserwacjach skupisk bakterii na powierz-chni nabłonka ucha środkowego zakażonych szynszyli z użyciem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) [24]. Na modelu tym wykazano obecność co najmniej trzech form bezotoczkowych szczepów *H. influenzae*, takich jak komórki planktonowe, fragmenty biofilmu oraz formy nitkowate, z których każda wykazywała inny wzór ekspresji genów [16].

Pierwsze badania pokazujące obecność mikrokolonii na błonie śluzowej u 26 dzieci z wysiękowym i/lub nawracającym zapaleniem ucha wewnętrznego przeprowadzono z użyciem MK oraz metody 16S rRNA FISH [12]. Umożliwiło to precyzyjną lokalizację każdego z trzech poszukiwanych gatunków bakterii: *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae* oraz *Moraxella catarrhalis* w próbkach z biopsji błony śluzowej ucha wewnętrznego. Jedynie z 19% próbek pobranych od chorych z wysiękiem z ucha wyhodowano bakterie. Natomiast specyficzne dla poszukiwanych gatunków bakterii fragmenty DNA wykryto metodą PCR we wszystkich badanych próbkach płynu wysiękowego. W 92% próbek z biopsji zaobserwowano mikrokolonie bakterii z użyciem MK. W próbach kontrolnych – bioptatach pobranych od ośmiu pacjentów, u których wykonywano zabieg wszczepienia implatów ślimakowych, nie znaleziono przylegających do błon śluzowych skupisk bakterii.

Mikrokolonie bakterii zaobserwowano przy użyciu SEM w 80% próbek tkanek pobranych z zatok przynosowych od 30 chorych z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej nosa i zatok przynosowych (CRS – *ang.* chronic rhinosinusitis) w trakcie endoskopii [29]. Podobne badania przeprowadzono na grupie siedmiorga dzieci, którym usunięto migdałki gardłowe z powodu CRS. Za pomocą SEM określano wielkość powierzchni tych migdałków, która została zasiedlona przez grubą warstwę drobnoustrojów [6]. Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy wielkością zasiedlonej powierzchni migdałków od dzieci z CRS (94,9%), a wielkością zasiedlonej powierzchni migdałków usuniętych dziewięciorgu dzieciom z zespołem obturacyjnego bezdechu sennego (1,9%). W 2007 r. przy użyciu MK wykazano obecność mikrokolonii jedynie w 44,7% bioptatów błony śluzowej przewodu środkowego nosowego i zatoki sitowej pobranych od 38 chorych z CRS [25]. Z 31 bioptatów wykonano posiewy na podłoża mikrobiologiczne; wyhodowano *Staphylococcus aureus* (z 16 próbek) i grzyby (z 6 próbek). Nie znaleziono zależności pomiędzy dodatnimi wynikami hodowli a obecnością mikrokolonii na powierzchni tkanek. Z użyciem MK poszukiwano również biofilmu *S. aureus* na modelu zwierzęcym, indukując zapalenie nosa i zatok przynosowych u owiec [11]. Wykazano wrost *S. aureus* w postaci mikrokolonii w zatokach wszystkich badanych owiec (n = 12) z eksperymentalnie utudnionym odpływem wydzieliny.

W tym samym roku podjęto pierwszą próbę jednoczesnego uwidocznienia komórek bakteryjnych i polisacharydów EPS na powierzchni tkanek, stosując barwienie preparatów wycinków migdałków za pomocą jodku propidyny i konkanawaliny A znakowanej izotiocjanianem fluoresceiny [15]. Jednakże barwienie z użyciem konkanawaliny A, lektyny wiążącej swoiście reszty α-glukozylowe i α-mannozylowe, nie było barwieniem specyficznym dla polisacharydów EPS bakterii. Badanie przeprowadzono na grupie 24 dzieci z przewlekłym lub nawracającym zapaleniem migdałków podniebiennych. Za pomocą SEM zaobserwowano, że bakterie przylegają do komórek nabłonka w 35,7% badanych migdałków (n = 14), tworząc mikrokolonie. Mikrokolonie te położone były w kryptach migdałków. Za pomocą MK wykazano w 70,8% badanych próbek (n = 24) obecność trójwymiarowych struktur zawierających ziarenkowce w amorficznej substancji, wiążącej konkanawalinę A.

Z powyższych obserwacji wynika, że w zakażeniach górnych dróg oddechowych w tkankach występują mikrokolonie rozproszone w trójwymiarowej amorficznej substancji. Jednakże ze względu na brak wyników świadczących o współwystępowaniu bakterii i charakterystycznych dla biofilmów polimerów EPS w badanych wycinkach tkanek niektórzy autorzy kwestionują obecność biofilmów *in vivo* [19]. Ponadto dotychczasowe wyniki wskazują, że mikrokolonie bakterii nie występują u wszystkich chorych. Obserwacje te utrudniają zatem roztrzygnięcie, czy mikrokolonie

stanowią „naturalny" stan kolonizacji dróg oddechowych gospodarza, czy też bezpośrednio uczestniczą w rozwoju zakażenia i/lub jego nawrotach. Są pewne przesłanki dla przypuszczeń, że na błonie śluzowej zatok mogą bytować niepatogenne biofilmy. Z 97% próbek popłuczyn z zatok osób, niewykazujących żadnych objawów chorobowych, wyhodowano koagulazoujemne gronkowce, gronkowca złocistego oraz maczugowce z rodzaju *Corynebacterium*. Wykazano jednakże, że chorzy z CRS, u których na błonach śluzowych zatok znaleziono mikrokolonie przy użyciu MK, stosunkowo szybko po zabiegach oparacyjnych odczuwają ponownie objawy CRS i wykazują objawy zapalenia w przeciwieństwie do tych chorych, u których występowania mikrokolonii nie obserwowano [26]. Wielogatunkowe mikrokolonie wykryto również w kryptach migdałków usuniętych dzieciom z bezdechem bez objawów zakażenia górnych dróg oddechowych [5].

Hipotezy dotyczące udziału biofilmów w patogenezie CRS zakładają następującą sekwencję rozwoju zakażenia: 1) błona śluzowa nosogardła ulega uszkodzeniu wskutek zakażenia wirusowego, reakcji uczuleniowej lub kwaśnego refluksu żołądkowo-jelitowego; 2) zostaje ona zasiedlona przez chorobotwórcze bakterie, które tworzą pierwotny biofilm, będący źródłem wtórnego zakażenia (okresowo rozsiewane są bakterie planktonowe); 3) w wyniku rozsiewu zostają zasiedlone jamy zatok szczękowych, na których błonie śluzowej rozwija się biofilm wtórny [6]. Obecność wtórnego biofilmu, którego nie można zwalczyć za pomocą antybiotyków warunkuje przewlekłe i nawracające zakażenia nosogardła i zatok.

3. Zakażenia oskrzelowo-płucne u chorych na mukowiscydozę

U chorych z przewlekłą chorobą oskrzelowo-płucną *P. aeruginosa* wytwarza śluz, przejawia wielolekooporność i znaczną zmienność fenotypową [10]. Pałeczki te bytują w postaci mikrokolonii o znacznej średnicy (>100 μm) w świetle dróg oddechowych w warstwie śluzu i nie przylegają bezpośrednio do komórek nabłonka, co zaobserwowano w wycinkach płuc siedmiu chorych na mukowiscydozę w wyniku analizy z użyciem SEM [33]. Warunki zmniejszonego ciśnienia tlenu panujące w warstwie śluzu indukują wzmożoną syntezę alginianu, podstawowego składnika EPS biofilmów *P. aeruginosa* [4]. Podobne zjawisko ekspresji śluzowego fenotypu zachodzi u *S. aureus* w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. Dehydratacja śluzu ogranicza przemieszczanie się bakterii w jego obrębie na pierwszym etapie kolonizacji i poprzez lokalne zwiększenie stężenia autoinduktorów systemu *quorum sensing* może pośrednio prowadzić do wytworzenia biofilmu [17].

W zakażeniach oskrzelowo-płucnych u chorych z mukowiscydozą obserwowana jest znaczna zmienność wewnątrzgatunkowa bakterii [13]. Klonalne izolaty *P. aeruginosa* w ciągu wielu lat kolonizacji chorego ulegają wielu mutacjom i zmianom fenotypowym [30]. U chorych tych można także zaobserwować znaczną zmienność międzygatunkową wśród drobnoustrojów izolowanych z dolnych dróg oddechowych. Sekwencjonowanie genu kodującego 16S rRNA drobnoustrojów z plwociny trzech chorych z mukowiscydozą pozwoliło na identyfikację 19 gatunków bakterii z 15 rodzajów, w tym wielu gatunków bakterii beztlenowych [28]. Metodami hodowlanymi wykazano występowanie znacznej liczby bakterii z rodzajów *Prevotella*, *Veillonella*, *Propionibacterium* i *Actinomyces* w 42 próbkach z 66 badanych (64%) [32].

Wobec nowych obserwacji z dziedziny ekologii dróg oddechowych chorych z mukowiscydozą rozważanie mechanizmów patogenezy zakażeń oskrzelowo-płucnych jest zadaniem trudnym. W dotychczasowych hipotezach dotyczących tego zagadnienia nie uwzględniano wzajemnych oddziaływań wielu chorobotwórczych drobnoustrojów oraz ich jednoczasowego wpływu na organizm gospodarza. Jeśli w tkankach chorego występują wielogatunkowe biofilmy, to czy warunkują one zwiększoną zjadliwość drobnoustrojów? Czy nieodwracalne uszkodzenia tkanek gospodarza, prowadzące do jego zgonu, powoduje silna odpowiedź immunologiczna? Jest wielu zwolenników ostatniego poglądu, którzy na jego poparcie przytaczają dowody świadczące o znacznym nasileniu odpowiedzi immunologicznej u chorych z mukowiscydozą, nieproporcjonalnym do intensywności bakteryjnego zakażenia [27].

Przez wiele lat jako pewnik przyjmowano stwierdzenie, że charakterystyczną cechą drobnoustrojów w biofilmach jest ich obniżona aktywność metaboliczna, wyrażająca się między innymi zmniejszonym wydzielaniem czynników zjadliwości. Miała być to jedna ze strategii pozwalająca na unikanie odpowiedzi immunologicznej, indukowanej przez rozpuszczalne antygeny – czynniki zjadliwości. Badania współczesne, pokazujące olbrzymie zróżnicowanie fenotypowe izolatów *S. aureus* uzyskanych od jednego pacjenta i ich wysoką aktywność metaboliczną, zaprzeczają powyższym twierdzeniom [34]. W molekularnych badaniach poziomu ekspresji genów *P. aeruginosa* wykazano, że w świeżo pobranych próbkach plwociny od 49-letniego chorego z mukowiscydozą jest obecne mRNA kodujące informacje o syntezie alginianu, lipaz, fosfolipaz, kilku proteaz, ramnolipidu i piocheliny [31]. Aktywność metaboliczną biofilmów można też zaobserwować w badaniach *in vitro*, obserwując wydzielanie aktywnych proteaz i piowerdyny *P. aeruginosa*

lub aspartylowej proteazy *Candida albicans* do podłoża hodowlanego [18, 22]. W plwocinie chorych z mukowiscydozą, z długotrwałym zakażeniem o etiologii *P. aeruginosa* (co najmniej 13 lat), pałeczki te stosunkowo szybko dzielą się – obserwacja ta nie jest zatem zgodna z wynikami badań *in vitro* sugerującymi wolny wzrost bakterii w biofilmach [35].

Obserwacje powyższe sugerują, że w biofilmach drobnoustroje nie są „uśpione" metabolicznie. Wydzielane przez nie czynniki zjadliwości mogą prowadzić do destrukcji tkanek gospodarza. Konieczność pozyskiwania składników odżywczych przez szybko dzielące się populacje bakterii może być jednym z mechanizmów prowadzących do bezpośrednich uszkodzeń tkanek (proteazy, lipazy) oraz indukcji silnej odpowiedzi zapalnej.

4. Zakażenia ran

Spośród ran przewlekle zakażonych najtrudniejsze w leczeniu są żylne owrzodzenia podudzi, zespół stopy cukrzycowej oraz rany odleżynowe. Podniesiony poziom cytokin i zwiększona aktywność metaloproteaz macierzy pozakomórkowej są charakterystycznymi cechami tych ran wraz z intensywnym napływem neutrofilów, wydzielających enzymy cytotoksyczne i cząsteczki prozapalne. Przewlekłe rany wypełnione są ziarniną, zbudowaną głównie z włókien kolagenu i glikoprotein macierzy pozakomórkowej, które są rozpoznawane przez chorobotwórcze drobnoustroje i mogą stanowić substraty ich swoistej adhezji do tkanek gospodarza.

B j a r n s h o l t i wsp. [3] pokazali w preparatach wycinków z przewlekłej rany obecność mikrokolonii bakterii otoczonych fagocytami, najprawdopodobniej neutrofilami. Podobne mikrokolonie bakterii otoczone amorficzną substancją polisacharydową zaobserwowano na zwierzęcym modelu rany zakażonej *S. aureus* na podstawie analizy materiałów biopsyjnych za pomocą mikroskopii świetlnej, SEM i FISH [7]. Mikrokolonie *S. aureus* i *Streptococcus pyogenes* obserwowano też w zapaleniu skóry u myszy przy użyciu MK [1, 2].

Szeroko zakrojone badania flory mikrobiologicznej przewlekłych ran przeprowadzili z użyciem technik biologii molekularnej (PCR, DGGE, i sekwencjonowania) J a m e s i wsp. [14]. Badaniom poddano 50 zakażonych ran przewlekłych i ostrych. Celem badań nie były jedynie obserwacje mikroskopowe powierzchni ran, ale też analiza różnorodności gatunkowej drobnoustrojów w ranach. Za pomocą SEM w 30 z 50 (60%) wycinków tkanek z ran przewlekłych obserwowano mikrokolonie bakterii, natomiast tylko w jednym wycinku z 16 (6%) zakażonych ran ostrych. Autorzy wykazali w przewlekłych ranach obecność co najmniej 15 różnych gatunków (rodzajów) bakterii, w tym beztlenowce z rodzajów *Prevotella*, *Clostridium* i *Porphyromonas*. Jeszcze większe zróżnicowanie gatunków i rodzajów bakterii w przewlekłych ranach zaobserwowali D o w d i wsp. [8]. Za pomocą pyrosekwencjonowania, DGGE, oraz sekwencjonowania techniką „shotgun" stwierdzili, że zarówno w zespole stopy cukrzycowej, żylnych owrzodzeniach podudzi, jak i w ranach odleżynowych w skład flory ran wchodzi co najmniej 20–30 gatunków (rodzajów) bakterii. Każdy z tych rodzajów ran charakteryzuje się nieco odmiennym składem gatunkowym bakterii, a najwyższy odsetek (62%) drobnoustrojów bezwzględnie beztlenowych występuje w ranach odleżynowych.

5. Podsumowanie

Obserwacje dotyczące flory mikrobiologicznej w przewlekłych ranach oraz w górnych i dolnych drogach oddechowych człowieka wskazują na jej dwie charakterystyczne cechy: wzrost drobnoustrojów w postaci mikrokolonii oraz ich znaczną różnorodność gatunkową. W celu pełnej charakterystyki chemicznej, fizjologicznej i mikrobiologicznej mikrokolonii występujących w tkankach konieczne są dalsze badania, które pozwolą na potwierdzenie lub wykluczenie ich podobieństwa do biofilmów na powierzchniach abiotycznych oraz określenie ich roli w patogenezie zakażeń człowieka.

Piśmiennictwo

1. Akiyama H., Huh W.K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K.: Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in mouse skin: does *S. aureus* generally produce a biofilm on damaged skin? *Br. J. Dermatol*. **147**, 879–885 (2002)
2. Akiyama H., Morizane S., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K.: Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. *J. Dermatol. Sci.* **32**, 193–199 (2003)
3. Bjarnsholt T., Kirketerp-Mřller K., Jensen P.Ø., Madsen K.G., Phipps R., Krogfelt K., Høiby N., Givskov M.: Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen.* **16**, 2–10 (2008)
4. Bragonzi A., Worlitzsch D., Pier G.B., Timpert P., Ulrich M., Hentzer M., Andersen J.B., Givskov M., Conese M., Doring G.: Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J. Infect. Dis.* **192**, 410–419 (2005)
5. Chole R.A., Faddis B.T.: Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. **129**, 634–636 (2003)
6. Coticchia J., Zuliani G., Coleman C., Carron M., Gurrola J. 2nd, Haupert M., Berk R.: Biofilm surface area in the pediatric nasopharynx: Chronic rhinosinusitis vs obstructive sleep apnea. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. **133**, 110–114 (2007)

7. Davis S.C., Ricotti C., Cazzaniga A., Welsh E., Eaglstein W.H., Mertz P.M.: Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen*. **16**, 23–29 (2008)
8. Dowd S.E., Sun Y., Secor P.R., Rhoads D.D., Wolcott B.M., James G.A., Wolcott R.D.: Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol*. **8**, 43 (2008)
9. Dongari-Bagtzoglou A.: Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **6**, 201–208 (2008)
10. Drenkard E., Ausubel F.M.: *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, **416**, 740–743 (2002)
11. Ha K.R., Psaltis A.J., Tan L., Wormald P.J.: A sheep model for the study of biofilms in rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol*. **21**, 339–345 (2007)
12. Hall-Stoodley L., Kerschner J.E. i wsp.: Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*, **296**, 202–211 (2006)
13. Harrison F.: Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, **153**, 917–923 (2007) (cytowana praca jest dziełem 15 autorów)
14. James G.A., Swogger E., Wolcott R., Pulcini E., Secor P., Sestrich J., Costerton J.W., Stewart P.S.: Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen*. **16**, 37–44 (2008)
15. Kania R.E., Lamers G.E., Vonk M.J., Huy P.T., Hiemstra P.S., Bloemberg G.V., Grote J.J.: Demonstration of bacterial cells and glycocalyx in biofilms on human tonsils. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **133**, 115–121 (2007)
16. Leroy M., Cabral H., Figueira M., Bouchet V., Huot H., Ram S., Pelton S.I., Goldstein R.: Multiple consecutive lavage samplings reveal greater burden of disease and provide direct access to the nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm in experimental otitis media. *Infect. Immun*. **75**, 4158–4172 (2007)
17. Matsui H., Boucher R.C. i wsp.: A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18131–18136 (2006) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
18. Mendes A., Mores A.U., Carvalho A.P., Rosa R.T., Samaranayake L.P., Rosa E.A.: *Candida albicans* biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells. *Biol. Pharm. Bull*. **30**, 1813–1815 (2007)
19. Moxon E.R., Sweetman W.A., Deadman M.E., Ferguson D.J.P., Hood D.W.: *Haemophilus influenzae* biofilms: hypothesis or fact? *Trends Microbiol.* **16**, 95–100 (2008)
20. Neut D., van der Mei H.C., Bulstra S.K., Busscher H.J.: The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *Acta Orthop*. **78**, 299–308 (2007)
21. Nikolaev Y.A., Plakunov V.K.: Biofilm – "City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology*, **76**, 125–138 (2007)
22. Ołdak E, Trafny EA.: Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother*. **49**, 3281–3288 (2005)
23. Parsek M.R., Singh P.K.: Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol*. **57**, 677–701 (2003)
24. Post J.C.: Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope*, **111**, 2083–2094 (2001)
25. Psaltis A.J., Ha K.R., Beule A.G., Tan L.W., Wormald P.J.: Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, **117**, 1302–1306 (2007)
26. Psaltis A.J., Weitzel E.K., Ha K.R., Wormald P.J.: The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am. J. Rhinol*. **22**, 1–6 (2008)
27. Rao S., Grigg J.: New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child*. **91**, 786–788 (2006)
28. Rogers G.B., Carroll M.P., Serisier D.J., Hockey P.M., Jones G., Bruce K.D.: Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5176–5183 (2004)
29. Sanclement J.A., Webster P., Thomas J., Ramadan H.H.: Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, **115**, 578–582 (2005)
30. Smith E.E., Olson M.V. i wsp.: Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8487–8492 (2006) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
31. Son M.S., Matthews W.J., Kang Y., Nguyen D.T., Hoang T.T.: *In vivo* evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun*. **75**, 5313–5324 (2007)
32. Tunney M.M., Elborn J.S. i wsp.: Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 995–1001 (2008) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
33. Worlitzsch D., Döring G. i wsp.: Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest*. **109**, 317–325 (2002) (cytowana praca jest dziełem 15 autorów)
34. Yarwood J.M., Paquette K.M., Tikh I.B., Volper E.M., Greenberg E.P.: Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* **189**, 7961–7967 (2007)
35. Yang L., Haagensen J.A., Jelsbak L., Johansen H.K., Sternberg C., Høiby N., Molin S.: In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J. Bacteriol*. **190**, 2767–2776 (2008)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 359–364
http://www.pm.microbiology.pl

BIOFILM JELITOWY – CZY MOŻNA I TRZEBA INGEROWAĆ W JEGO SKŁAD I FUNKCJONOWANIE?

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Beata Sadowska*, Barbara Różalska

Zakład Biologii Zakażeń, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii i Immunologii
Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, tel. (42) 635 43 65, fax. (42) 665 58 18
* Autor korespondencyjny: e-mail: bsad@biol.uni.lodz.pl

1. Wstęp. 2. Biofilm jelitowy. 2.1. Etapy kształtowania. 2.2. Immunobiologiczna rola naturalnej mikroflory jelit. 3. Ingerencja w naturalny biofilm jelitowy – za i przeciw. 4. Podsumowanie

Intestinal biofilm – can we and should we interfere in its composition and activity?

Abstract: The mammalian microbiota contains thousands of cells of different bacterial species, mainly associated with the skin and mucous membranes. They usually form very well organized communities attached to a surface and enclosed in a matrix, namely biofilms. Intestinal tract is the richest in bacteria ecological micro-niche in the human body. Consortia of gut bacteria include such genera as *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium* and *Escherichia*. Intestinal biofilm develops very early after birth and has an important role in human nutrition and health. First of all, natural gut microflora prevents pathogen colonization through competition for the attachment sites and nutrients, as well as trough the production of antibacterial compounds and the modification of intestinal conditions. It also educates and maintains mucosal immunity by stimulating local lymphocytes and antigen presenting cells. Gut-associated lymphoid tissue contains the largest pool of immunocompetent cells in the human body, which are the basis for systemic immune competence. The observed effects of commensal gut bacteria activity have led to the development of a new field of probiotics – "live microbial food ingredients that are beneficial to health". By applying probiotic bacteria (mainly *Lactobacillus* strains), we can interfere in the gut biofilm, which sometimes is necessary, for instance for the restoration of natural microflora destroyed during antibacterial therapy. However, before making the decision about the application of probiotics, we should consider also their immune modulation ability.

1. Introduction. 2. Intestinal biofilm. 2.1. Process of formation. 2.2. Immunobiological role of commensal gut bacteria. 3. Interference in gut biofilm – the pros and cons. 4. Conclusions.

Słowa kluczowe: biofilm, naturalna mikroflora jelit, modulacja odpowiedzi immunologicznej, probiotyki
Key words: biofilm, commensal gut bacteria, immune modulation, probiotics

1. Wstęp

Biofilmy bakteryjne są strukturami uniwersalnymi, począwszy od tych żyjących w środowisku naturalnych zbiorników wodnych czy w mikoryzach glebowych, do biofilmów tworzonych w różnych miejscach anatomicznych organizmu zwierząt i ludzi. Biofilmy naturalne zwykle składają się z wielu gatunków drobnoustrojów, pozostających tam w stosunku symbiozy lub komensalizmu, podczas gdy biofilmy odpowiedzialne za stan chorobowy tworzone są najczęściej przez jeden gatunek. Wynika to, między innymi, ze słabiej lub silniej wyrażonego wzajemnego oddziaływania bakterii na siebie – symbiotycznego lub konkurencyjnego, zmierzającego do sukcesji danej mikroniszy [2, 12, 14, 25, 29, 34].

Zjawisko symbiozy/kooperacji bakterii można zaobserwować już w pierwszej fazie tworzenia biofilmu naturalnego, którą jest przyleganie drobnoustrojów do powierzchni stałej. Proces tworzenia biofilmu zapoczątkowują bakterie o silnych właściwościach adhezyjnych (pierwotne organizmy kolonizatorskie). Kolejno, do ich mikrokolonii ulegają adhezji komórki tego samego lub innych gatunków bakterii (wtórne organizmy kolonizatorskie). Na tym etapie znaczenie ma również zjawisko koagregacji (przyleganie do siebie genetycznie odmiennych bakterii) oraz koadhezji (przyleganie utworzonych koagregatów do mikrokolonii pierwotnych kolonizatorów). Wybitną zdolność do koagregacji wykazują drobnoustroje wchodzące w skład naturalnych ekosystemów: bakterie płytki nazębnej, izolowane z systemów wodnych, drobnoustroje izolowane z układu moczo-płciowego człowieka, ale przede wszystkim układu pokarmowego [3, 6, 12, 13, 26].

W relacjach między drobnoustrojami często ma miejsce również ostra konkurencja, której celem jest zajęcie i utrzymanie określonej niszy ekologicznej. Dominujące drobnoustroje zyskują wtedy lepszy dostęp do środków odżywczych, mimo iż większość naturalnych ekosystemów obfituje zarówno w przestrzeń, jak i materiały pokarmowe. Zupełnie odmienne warunki panują we wnętrzu organizmów żywych, np. człowieka i zwierząt, w których drobnoustroje próbują znaleźć dla siebie nisze ekologiczne. Tym samym, konkurencja między mikroorganizmami musi być w tym wypadku silniej wyrażona, aby była efektywna [9, 13, 18, 32].

Rozpatrując reakcje antagonistyczne między drobnoustrojami należy podkreślić fakt istnienia dwóch

odmiennych, chociaż często uzupełniających się sposobów oddziaływania. Do niedawna sądzono, iż działanie „bezpośrednie" na komórki konkurencyjnych bakterii jest jedyną możliwością. W jej ramach mieści się zarówno zmiana fizyko-chemicznych warunków otoczenia, jak i produkcja różnego rodzaju związków powierzchniowo czynnych, typu surfaktantów i bakteriocyn. Zdolność taką posiada szereg drobnoustrojów, a biologiczna rola tych związków jest bardzo zróżnicowana. Obejmuje ona między innymi modyfikację powierzchni nierozpuszczalnych substratów tak, by stały się one przyswajalne dla drobnoustrojów, zmianę zdolności adhezyjnych bakterii, wiązanie metali ciężkich, a wiele z produkowanych surfaktantów czy bakteriocyn wykazuje również działanie bakteriobójcze lub bakteriostatyczne [21, 28, 31, 33]. Ostatnio wiele uwagi poświęca się również drugiemu z możliwych sposobów wzajemnego oddziaływania mikroorganizmów – kontroli ekspresji określonych genów danej populacji przez produkty ekspresji genów populacji symbiontów lub antagonistów zasiedlających wspólny ekosystem abiotyczny lub biotyczny [13, 16, 21, 24, 35].

Jak wynika z przestawionych rozważań, stosunki panujące w świecie drobnoustrojów bywają bardzo złożone i mogą przyjmować zupełnie skrajne formy w zależności od bilansu ewentualnych zysków i strat, czyli aktualnych potrzeb mikroorganizmów znajdujących się w określonej niszy ekologicznej.

2. Biofilm jelitowy

2.1. Etapy kształtowania

Najbogatszym w drobnoustroje ekosystemem w organizmie człowieka jest układ pokarmowy – w końcowym odcinku jelita osób dorosłych liczba bakterii dochodzi do 10^{11}–10^{12} CFU na 1 g masy kałowej, a liczba gatunków dominujących sięga 40 spośród kilkuset różnych gatunków wyizolowanych z jelita grubego człowieka. Utworzenie tak złożonego i bogatego w drobnoustroje ekosystemu wymaga czasu [15, 17, 19].

Zakłada się, iż zdrowy płód w macicy pozostaje jałowy, między innymi dzięki obecności w szyjce macicy specjalnego „czopu" (*cervical plug*), który oddziela skolonizowaną pochwę od sterylnej jamy macicy i dodatkowo zawiera peptydy bójcze. Ponadto komórki łożyska uwalniają do wód płodowych różne czynniki o charakterze przeciwzakaźnym, jak białko BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*), defensyny, fosfolipaza A2, laktoferyna. Pierwszy kontakt płodu z drobnoustrojami następuje w trakcie porodu, i tak, w ciągu 12–24 godzin od urodzenia rozpoczyna się kolonizacja układu pokarmowego. Jako pierwsze pojawiają się w nim bakterie względnie beztlenowe – zwykle są to pałeczki *Escherichia coli* i ziarniaki z rodzaju *Enterococcus* sp. Drobnoustroje te, wykorzystując tlen obecny w jelitach noworodka, przygotowują mikroniszę układu pokarmowego do zasiedlenia przez bakterie bezwzględnie beztlenowe. Około 7–10 dnia po porodzie, w jelitach pojawiają się zatem takie drobnoustroje, jak *Bifidobacterium* sp., *Clostridium* sp. czy *Bacteroides* sp. Mniej więcej w tym samym czasie, układ kolonizowany jest również przez *Lactobacillus* sp. Jednak obecność, liczebność czy proporcje danych rodzajów bakterii kolonizujących jelita noworodka stanowią cechę osobniczą, zależną od wielu czynników zewnętrznych. W tym, zależną od sposobu narodzin (poród naturalny, cesarskie cięcie), terminu porodu (prawidłowy, przedwczesny) czy od sposobu karmienia (mleko matki, pokarm sztuczny). Noworodki urodzone przedwcześnie albo za pomocą cesarskiego cięcia zwykle zasiedlane są z opóźnieniem i często, z uwagi na warunki/formę porodu oraz konieczność późniejszego przebywania w inkubatorach podtrzymujących ich funkcje życiowe, są kolonizowane drobnoustrojami ze środowiska szpitalnego, co niestety, może stanowić zagrożenie dla ich zdrowia, a nawet życia. Badania dowiodły również, iż bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* sp. częściej i liczniej zasiedlają jelita niemowląt karmionych naturalnie mlekiem matki niż karmionych sztucznymi mieszankami [19].

Ostateczny skład mikroflory jelitowej kształtuje się u dzieci w wieku 7–10 lat i bez ingerencji czynników zewnętrznych (np. doustnej antybiotykoterapii) pozostaje w miarę stabilny aż do okresu starości. Dominują w niej bakterie bezwzględnie beztlenowe, a główni przedstawiciele należą do takich rodzajów, jak: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococus*, *Peptococcus*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* czy *Escherichia*. Tym samym, skład gatunkowy naturalnej flory jelita u większości ludzi jest podobny, choć może też posiadać pewne cechy indywidualne zależne od otoczenia, diety czy stanu fizjologicznego gospodarza [15, 17, 19].

2.2. Immunobiologiczna rola naturalnej mikroflory jelit

Mówiąc o znaczeniu naturalnej flory układu pokarmowego dla makroorganizmu można wyróżnić trzy podstawowe obszary jej działania: korzyści „odżywcze" czerpane przez gospodarza, a wynikające z właściwości metabolicznych drobnoustrojów, ochrona przed zakażeniami z udziałem patogenów, oparta głównie na zjawisku konkurencji między mikroorganizmami oraz edukacja układu odpornościowego gospodarza.

Korzyści „odżywcze", które gospodarz odnosi z symbiozy z drobnoustrojami przewodu pokarmowego, opierają się z jednej strony na rozkładzie złożonych

związków biochemicznych, z drugiej zaś na syntezie lub/i przyswajaniu związków, których sam nie potrafi wyprodukować, a których obecność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu. I tak, wiele cukrów, białek i tłuszczy może stać się dla organizmu wyższego źródłem energii, pośrednich związków budulcowych i metabolicznych czy pierwiastków dopiero po wstępnym przetworzeniu przez drobnoustroje dysponujące odpowiednimi zestawami enzymów. Między innymi poruszana jest kwestia zatrzymywania azotu w organizmie człowieka, co następuje dzięki przekształcaniu, przez bakterie mikroflory układu pokarmowego, mocznika uwalnianego do jelit (około 30% całkowitej produkcji tego związku) w aminokwasy dostępne dla organizmu gospodarza. Symbiotyczne drobnoustroje przewodu pokarmowego są również producentami wielu witamin, takich jak witamina B_{12}, K, kwas foliowy, biotyna czy ryboflawina (witamina B_2), co swego czasu znalazło przełożenie na izolację szczepów wykorzystywanych do produkcji witamin na skalę przemysłową. Obecność mikroflory jelitowej wpływa także na procesy detoksyfikacyjne, np. na wiązanie i szybsze uwalnianie metali ciężkich z organizmu oraz powoduje pozytywną transformację i przyswajanie wielu dodatkowych związków (nie tyle o funkcjach strategicznych, co uzupełniających), dostarczanych wraz z pokarmem [11, 17, 19].

Jak już wspomniano, działanie przeciwzakaźne mikroflory układu pokarmowego oparte jest przede wszystkim na zjawisku konkurencji. Drobnoustroje, które jako pierwsze zasiedlą nie tylko przewód pokarmowy, ale i dowolną inną mikroniszę, dysponują wieloma środkami umożliwiającymi im działanie antagonistyczne w stosunku do ewentualnych konkurentów, w tym także patogenów. Przede wszystkim, mają już przewagę fizyczną, zajmując określone miejsce i blokując receptory na powierzchni komórek gospodarza. Tym samym współzawodniczą o składniki odżywcze występujące w danej mikroniszy. Dodatkowo mogą w sposób chemiczny modyfikować środowisko, np. zmieniając jego pH, potencjał oksydoredukcyjny czy produkując metabolity toksyczne dla innych drobnoustrojów (np. pałeczki *E. coli* są producentami kolicyn). Warto zwrócić także uwagę na jeden z pośrednich sposobów konkurencyjnego działania mikroflory układu pokarmowego, która wpływa na komórki jelita tak, by zmianie uległ skład śluzu pokrywającego nabłonek, a co za tym idzie także miejsca adhezyjne dla drobnoustrojów [4, 7, 11, 15, 17].

Kolejną, niezwykle istotną rolę odgrywa naturalna mikroflora jelitowa w szeroko rozumianej edukacji układu odpornościowego. Dotyczy to zarówno odporności miejscowej, warunkowanej głównie przez tkankę limfatyczną błony podśluzowej i śluzowej układu pokarmowego – GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), jak i odporności ogólnoustrojowej, będącej wynikiem migracji aktywowanych komórek immunokompetentnych. Niemniej, faza indukcyjna tego zjawiska zachodzi w jelitach. Podstawową funkcją tkanki limfatycznej błon śluzowych jest produkcja przeciwciał klasy IgA w ich formie sekrecyjnej (s-IgA), które spełniają rolę obronną głównie przez opłaszczanie i aglutynację drobnoustrojów, co zapobiega ich adhezji i przechodzeniu przez barierę błon śluzowych oraz ułatwia ich fagocytozę. Do indukcji odpowiedzi immunologicznej, w wyniku między innymi kontaktu z drobnoustrojami przewodu pokarmowego lub składnikami ich komórek (np. lipopolisacharydem – LPS), dochodzi przede wszystkim w zorganizowanych strukturach limfatycznych układu GALT – kępkach Peyera. Drobnoustroje i pochodzące od nich makrocząsteczki są wychwytywane przez komórki M, licznie obecne w nabłonku pokrywającym grudki limfatyczne. Następnie ich antygeny mogą być bezpośrednio prezentowane limfocytom (stanowią podstawowy składnik grudek limfatycznych) lub podlegają dalszej „obróbce" w makrofagach i dopiero przez nie, bądź przez inne komórki, np. dendrytyczne obecne w regionach podnabłonkowych kępków, są prezentowane limfocytom. Limfocyty pierwotnie aktywowane w kępkach Peyera przedostają się wraz z limfą do węzłów chłonnych, gdzie dochodzi do ich dalszego dojrzewania, potem do krwiobiegu. Wraz z krwią ponownie wracają do błon śluzowych, m.in. przewodu pokarmowego, gdzie jako w pełni dojrzałe komórki produkujące przeciwciała lokują się głównie w rejonie podstawy kosmków. Cały proces dojrzewania limfocytów B i przekształcania ich w plazmocyty IgA+ jest zjawiskiem niezwykle złożonym i jego omawianie nie jest celem niniejszego opracowania. Z uwagi na rozważaną rolę biologiczną mikroflory układu pokarmowego, należy wspomnieć o jednym z jego etapów, tj. przełączaniu klas produkowanych przeciwciał, które zachodzi w kępkach Peyera. Jednym z czynników regulujących przełączanie klas jest sam antygen i wykazano, że LPS (aktywnie uwalniany przez drobnoustroje flory naturalnej jelit od samego początku ich zasiedlania) ma zdolność do przełączania profilu produkowanych przeciwciał z IgM na IgA [7, 8, 10, 30].

Innym, kluczowym i niestety nie do końca wyjaśnionym zjawiskiem, obserwowanym w ramach edukacji układu odpornościowego gospodarza jest miejscowa tolerancja na zwykle działające silnie prozapalnie antygeny drobnoustrojów mikroflory naturalnej jelit, takie jak flagellina czy peptydoglikan (PG). Prawdopodobnie, częściowo wynika ona z bardzo wczesnego (tuż po urodzeniu) zasiedlania układu pokarmowego przez te drobnoustroje, kiedy fizyczna bariera szczelności błon śluzowych jelit nie jest jeszcze w pełni rozwinięta, a składnikami układu GALT są przede

wszystkim komórki naiwne. Łatwo dochodzi wówczas do przenikania antygenów bakteryjnych do warstw podśluzówkowych i prezentacji ich komórkom immonokompetentnym jako naturalnych dla tej mikroniszy antygenów. Może to indukować delecję klonalną, anergię i aktywną supresję komórek układu odpornościowego, co leży u podstaw zjawiska tolerancji, w tym także tolerancji pokarmowej. Jednak samo ułatwione przechodzenie antygenów do warstwy podśluzówkowej nie jest wystarczającym wyjaśnieniem, tym bardziej, że u dzieci obserwuje się tzw. alergie pokarmowe (zwykle zanikające wraz z wiekiem), których przyczyn upatruje się właśnie w bardziej intensywnym przenikaniu antygenów spożywanych wraz z pokarmem przez błonę śluzową jelit. Prawdopodobnie, tak jak w przypadku rozwoju tolerancji pokarmowej, rozwój tolerancji na antygeny bakteryjne zależy również od samego antygenu, jego dawki, częstości pojawiania i typu indukowanej przezeń odpowiedzi immunologicznej oraz od aktywacji produkcji określonego profilu cytokin. Prowadzone badania wskazują również na limfocyty T regulatorowe i ich udział w aktywnej supresji, jako podstawę rozwoju zjawiska tolerancji (zarówno miejscowej, jak i ogólnoustrojowej) na drobnoustroje autochtoniczne [4, 17, 22]. Stwierdzono także przeciwzapalną aktywność niektórych bakterii wchodzących w skład mikroflory jelit, np. beztlenowych pałeczek *Bacteroides thetaiotaomicron*. Aktywność ta nie ujawnia się swoiście tylko w obecności drobnoustrojów autochtonicznych i ich produktów, ale również w przypadku pojawienia się patogenów. Oparta jest bowiem na zjawisku hamowania wewnątrzkomórkowego przenoszenia sygnałów z receptorów TLR (*toll-like receptors*) – głównych receptorów na komórkach gospodarza, rozpoznających charakterystyczne struktury bakterii, takie jak PG oraz na inaktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB [1, 8, 17]. Prawdopodobnym jest, iż wszystkie mechanizmy wyjaśniające zjawisko tolerancji na antygeny bakterii stanowiących naturalna mikroflorę jelit są poprawne i funkcjonują równolegle, jednak niezależnie od podstaw fizjologicznych czy molekularnych tego zjawiska trudno wyobrazić sobie skutki braku istnienia tego typu tolerancji.

3. Ingerencja w naturalny biofilm jelitowy – za i przeciw

Obserwacje naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego i zwrócenie uwagi na jej istotną rolę biologiczną przyczyniły się do rozwoju nowej dyscypliny badawczej zajmującej się możliwościami wykorzystania w praktyce (głównie w profilaktyce i ochronie zdrowia, ale także w terapii zakażeń) szczepów bakterii i grzybów odpowiednio wyselekcjonowanych spośród drobnoustrojów naturalnie zasiedlających między innymi układ pokarmowy. Pałeczki *Lactobacillus*, z uwagi na swoje wyjątkowe właściwości i szeroki wachlarz sposobów antagonistycznych oddziaływań, stanowią główny obiekt zainteresowania naukowców z tej dziedziny. W literaturze światowej dają się wyodrębnić dwa główne kierunki badań: śledzenie efektów miejscowego zastosowania *Lactobacillus* (probiotyki) oraz analiza ich działania protekcyjnego przeciwko zakażeniu czy zapaleniu odległego w czasie i miejscu, będącego wynikiem modulacji odpowiedzi układu odpornościowego (immunobiotyki) [11, 20, 23, 30].

Miejscowe działanie probiotycznych szczepów *Lactobacillus* skupia się z jednej strony na ich aktywności antagonistycznej w stosunku do innych drobnoustrojów (w tym patogennych) próbujących zasiedlić mikroniszę jelita, z drugiej zaś na ich korzystnym wpływie na barierę anatomiczną błon śluzowych jelit. Aktywność antagonistyczna *Lactobacillus* opiera się przede wszystkim na zjawisku konkurencji drobnoustrojów, zarówno o miejsce do zasiedlenia, jak i o substancje odżywcze. Przydatne w tym celu okazują się zdolności adhezyjne tych bakterii wykazywane w stosunku do komórek nabłonkowych błon śluzowych, synteza białek wiążących ECM (*extracellular matrix proteins*) oraz umiejętność tworzenia naturalnego biofilmu. Rozwijające się pałeczki *Lactobacillus* są również producentami wielu czynników o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, np. bakteriocyn, nadtlenku wodoru czy kwasów organicznych obniżających pH środowiska. Korzystny wpływ *Lactobacillus* na barierę anatomiczną błon śluzowych związany jest między innymi ze stymulacją produkcji śluzu tworzącego warstwę ochronną nabłonka jelitowego oraz z przywracaniem prawidłowej przepuszczalności nabłonka w sytuacji zaistnienia stanu zapalnego [5, 11, 20, 27, 30]. Inny aspekt oddziaływania tych drobnoustrojów na komórki nabłonka częściowo nakłada się już na zjawisko modulacji odpowiedzi układu odpornościowego. Stwierdzono regulacyjny wpływ *Lactobacillus* na produkcję cytokin, zarówno przez enterocyty, jak i prezentujące antygen komórki dendrytyczne rozsiane w śluzówce jelita oraz makrofagi. Po podaniu probiotycznych szczepów tych pałeczek obserwowano hamowanie wydzielania cytokin pozapalnych, takich jak TNF-α, IL-8, IL-12p70 (choć równie często donosi się o nasileniu produkcji TNF-α, jednak pozostającym bez wpływu na eskalację odpowiedzi zapalnej). Dochodzi także do pobudzenia syntezy cytokin przeciwzapalnych (TGF-β) i regulatorowych (IL-4, IL-6, IL-10) oraz zależnego od profilu produkowanych cytokin przesunięcia równowagi między odpowiedzią immunologiczną typu Th1 i typu Th2, zwykle na korzyść odpowiedzi typu humoralnego z uruchomieniem produkcji przeciwciał klasy IgA i IgG.

Immunomodulacyjna aktywność *Lactobacillus* może przybierać nie tylko formę miejscową, ale rozszerzać się na oddziaływanie ogólnoustrojowe. Jako efekt działania tych drobnoustrojów obserwuje się wzrost ogólnej liczby komórek NK, nasilenie aktywności makrofagów, wzrost liczby aktywowanych limfocytów B i T, zarówno obrębie układu odpornościowego przewodu pokarmowego (GALT), jak i krążących w krwiobiegu. Wykazano także wzrost produkcji IFN-γ, którego obecność jest niezbędna do dojrzewania niektórych komórek układu odpornościowego i kontroli ich proliferacji [10, 11, 22, 27, 30]. Należy podkreślić, iż efekt działania probiotyku na układ odpornościowy gospodarza zależy od użytego szczepu drobnoustroju, a ściślej mówiąc od budowy struktur bakterii, takich jak peptydoglikan czy kwas lipotejchojowy (LTA). Struktury te są rozpoznawane przez specyficzne receptory na komórkach gospodarza, tzw. PPR (*pattern recognition receptors*), np. receptory TLR. Nawet od niewielkich różnic w budowie PG czy LTA zależy aktywacja określonego typu receptorów TLR i tym samym uruchomienie innej kaskady sygnałów biochemicznych, co w konsekwencji może prowadzić do zupełnie odmiennych efektów, jak produkcja cytokin przeciwzapalnych lub cytokin pozapalnych [1, 22].

Osobną kwestią jest badanie możliwości wykorzystania w terapii nie tyle samych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, co ich produktów metabolizmu wykazujących działanie antybiotyczne lub surfaktantowe. Taki nurt badań koncentruje się na pogłębianiu wiedzy dotyczącej zapobieganiu lub leczeniu zakażeń, w których znaczenie ma tworzenie biofilmów drobnoustrojów [28, 31, 33].

4. Podsumowanie

Nie ulega wątpliwości, iż prawidłowo rozwinięta i funkcjonująca mikroflora jelita stanowi najlepszy element obrony tej mikroniszy przed zakażeniami wywołanymi drobnoustrojami patogennymi oraz edukacji układu odpornościowego gospodarza. Podobne funkcje spełniają mikroorganizmy probiotyczne. Wiedza na temat ich właściwości pozwala na zastosowanie probiotyków u ludzi w przypadku zaburzeń jakościowych i ilościowych składu naturalnej mikroflory układu pokarmowego, spowodowanych przykładowo odmienną dietą, zmianami hormonalnymi czy innymi chorobami współtowarzyszącymi, ale przede wszystkim antybiotykoterapią. Nie należy równocześnie zapominać o właściwościach immunomodulacyjnych probiotyków, które w wielu przypadkach wydają się korzystne dla organizmu gospodarza, głównie przez swoje działanie przeciwzapalne. Jednak efekty oddziaływania organizmów probiotycznych na układ odpornościowy zależą zarówno od użytego szczepu bakterii, jak i od stanu pobudzenia komórek błon śluzowych jelit gospodarza. Tym samym są trudne do przewidzenia, a uniwersalność struktur bakterii biorących udział w relacjach gospodarz-patogen, które mogą zarówno wywołać reakcję zapalną, jak i ją wyhamować, dodatkowo komplikuje obraz działania probiotyków. Stąd w literaturze spotyka się czasem sprzeczne informacje dotyczące uogólnionych efektów stosowania drobnoustrojów probiotycznych, tak jak hamowanie/nasilenie produkcji TNF-α czy przesunięcie odpowiedzi immunologicznej na korzyść odpowiedzi humoralnej (Th2) lub komórkowej (Th1), co może prowadzić do rozwoju procesów patologicznych, takich jak alergie, przewlekłe zapalenie jelit czy zmiany nowotworowe. Tak więc, efekty działania probiotyków, zwłaszcza z zakresu modulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza, powinno się zawsze odnosić do danego szczepu. Wszystkie te aspekty należy niewątpliwie wziąć pod uwagę przed podjęciem decyzji o ingerencji w skład mikroflory układu pokarmowego, szczególnie z zastosowaniem probiotycznych preparatów farmaceutycznych.

Piśmiennictwo

1. Aldridge P.D., Gray M.A., Hirst B.H., Anjam Khan C.M.: Who's talking to whom? Epithelial-bacterial pathogen interactions. *Molec. Microb.* **55**, 655–663 (2005)
2. Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R.: Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**, 20–26 (2005)
3. Campanac C., Pineau L., Payard A., Baziard-Mouysset G.: Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1469–1474 (2002)
4. Clancy R.: Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol. Med. Microb.* **38**, 9–12 (2003)
5. Cross M.L.: Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **34**, 245–253 (2002)
6. Darouiche R.O.: Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin. Inf. Dis.* **33**, 1567–1571 (2001)
7. Everett M.L., Palestrant D., Miller S.E., Bollinger R.R., Parker W.: Immune exclusion and immune inclusion: A new model of host-bacteria interactions in the gut. *Clin. Appl. Immunol. Rev.* **4**, 321–332 (2004)
8. Foligne B., Zoumpopoulou G., Dewulf J., Ben Younes A., Chareyre F., Sirard J-C., Pot B., Grangette C.: A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PloS ONE*, **3**, e313 (2007)
9. Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P.: Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**, 34–40 (2005)
10. Galdeano C.M., de Moreno de LeBlanc A., Vinderola G., Bibas Bonet M.E., Perdigon G.: Proposed model: mechanism of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin. Vacc. Immunol.* **14**, 485–492 (2007)

11. Grajek W., Sip A.: Aktywność antagonistyczna mikroorganizmów probiotycznych wobec drobnoustrojów chorobotwórczych. *Zakażenia*, **1**, 49–54 (2006)
12. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 95–107 (2004)
13. Hall-Stoodley L., Stoodley P.: Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13**, 7–10 (2005)
14. Jefferson K.K.: What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 163–173 (2004)
15. Kaper J.B., Sperandino V.: Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **73**, 3197–3209 (2005)
16. Keller L., Surette M.G.: Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Rev. Microbiol.* **4**, 249–258 (2006)
17. Kelly D., Conway S., Aminov R.: Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol.* **26**, 326–333 (2005)
18. Leid J.G., Shirtliff M.E., Costerton J.W., Stoodley P.: Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect. Immun.* **70**, 6339–6345 (2002)
19. Libudzisz Z.: Mikroflora jelitowa człowieka a probiotyki. *Zakażenia*, **6**, 47–51 (2004)
20. Libudzisz Z., Klewicka E.: Bakterie fermentacji mlekowej w produktach probiotycznych. *Zakażenia*, **4**, 57–62 (2006)
21. Mah T-F.C., O'Toole G.A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**, 34–39 (2001)
22. Marcinkiewicz J.: Wpływ probiotyków na układ odpornościowy. *Zakażenia*, **3**, 37–40 (2005)
23. Moore A.: Finding my enemy's enemies. *EMBO Reports*, **5**, 754–757 (2004)
24. Parsek M.R., Greenberg E.P.: Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* **13**, 27–33 (2005)
25. Prakash B., Veeregowda B.M., Krishnappa G.: Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Curr. Sci.* **85**, 1299–1307 (2003)
26. Rickard A.H., Gilbert P., High N.J., Kolenbrander P.E.: Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* **11**, 94–100 (2003)
27. Rochat T., Bermudez-Humaran L., Gratadoux J-J., Fourage C., Hoebler C., Corthier G., Langella P.: Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb. Cell Fact.* **6**, 22 (2007)
28. Rodrigues L., Van der Mei H., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.: Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Appl. Genet. Molec. Biotech.* **66**, 306–311 (2004)
29. Schachter B.: Slimy business-the biotechnology of biofilms. *Nature Biotech.* **21**, 361–366 (2003)
30. Shida K., Suzuki T., Kiyoshima-Shibata J., Shimada S-I., Nanno M.: Essentials roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. *Clin. Vacc. Immunol.* **13**, 997–1003 (2006)
31. Singh P., Cameotra S.S.: Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Microbiol.* **22**, 142–146 (2004)
32. Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P., Welsh M.J.: A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, **417**, 552–555 (2002)
33. Walencka E., Różalska S., Sadowska B., Różalska B.: The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol.* **53**, 61–66 (2008)
34. Watnick P., Kolter R.: Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**, 2675–2679 (2000)
35. Williams P.: Quorum sensing. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 57–59 (2006)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 365–370
http://www.pm.microbiology.pl

INGERENCJA CZŁOWIEKA W KOMUNIKOWANIE SIĘ DROBNOUSTROJÓW

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Eugenia Gospodarek*, Patrycja Zalas

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, 85-094 Bydgoszcz, ul. Skłodowskiej-Curie 9, tel. (52) 585 40 47
* Autor korespondencyjny: e-mail: gospodareke@cm.umk.pl

1. Wprowadzenie. 2. System komunikacji między bakteriami i nowym celem terapeutycznym. 3. Chemiczna inaktywacja cząsteczek sygnałowych quorum sensing. 4. Enzymatyczna inaktywacja i biodegradacja molekuł quorum sensing. 4.1. Bakteryjne laktonazy AHL. 4.2. Bakteryjne acylazy AHL. 4.3. Acylazy eukariotyczne. 5. Zastosowanie agonistów quorum sensing. 6. Hormony ludzkie interferujące z quorum sensing. 7. Inne metody niszczenia quorum sensing. 8. Ograniczenia zniszczenia bakteryjnego quorum sensing. 8.1. Rozwój oporności. 8.2. Brak specyficzności. 9. Podsumowanie

Human interference in the communication between microorganisms

Abstract: Many pathogenic bacteria rely on quorum sensing (QS) circuits as central regulators of virulence expression. The observation of the relationship between the QS systems and the virulence factors production and biofilm formation suggests that many bacteria could lose their pathogenicity after using inhibitors of QS systems. Therefore, the interference in bacterial cell-to-cell signalling is a promising strategy for the development of novel antimicrobial agents. Such drugs would have novel mechanisms of action and might, therefore, be more effective against antibiotic-resistant strains of bacteria.

Several possible methods for the disruption of QS systems are under research. They include: the inhibition of molecule signal production, the usage of antagonists and agonists of QS, chemical inactivation of QS signals, biodegradation of molecule signals by bacterial and eucaryotic lactonase and acylase.

1. Introduction. 2. Bacterial communication as a new therapeutic target. 3. Chemical inactivation of quorum sensing signal molecules. 4. Enzymatic inactivation and biodegradation of quorum sensing molecules. 4.1. Bacterial lactonase of AHL. 4.2. Bacterial acylase of AHL. 4.3. Eucaryotic acylase. 5. Use of agonists of quorum sensing. 6. Human hormones interfering with quorum sensing. 7. Another methods for the diruption of quorum sensing. 8. Limitations of the destruction of bacterial quorum sensing. 8.1. Development of resistance. 8.2. Absence of specificity. 9. Summary

Słowa kluczowe: quorum sensing, biofilm, inhibitory quorum sensing
Key words: quorum sensing, biofilm, inhibitors of quorum sensing

1. Wprowadzenie

Quorum sensing (QS) jest mechanizmem, dzięki któremu bakterie koordynują ekspresję pewnych genów w odpowiedzi na własną gęstość populacji poprzez wytwarzanie, wyzwalanie i wykrywanie cząsteczek sygnałowych, zwanych autoinduktorami. System ten wykryto po raz pierwszy u morskich bakterii *Vibrio fischeri* [22]. Obecność podobnych systemów stwierdzono u wielu bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Bakterie Gram-ujemne wykorzystują jako cząsteczki sygnałowe acylowany lakton homoseryny (AHL). Systemy QS oparte o AHL mogą występować także u bakterii Gram-dodatnich, jednak te częściej wykorzystują związki peptydowe (AIP) jako cząsteczki sygnałowe. Trzeci system QS, poznany pierwotnie u świecącej bakterii *Vibrio harveyi* [3] zawiera 2 komponenty: autoinduktor 1 (AI-1) i autoinduktor 2 (AI-2). AI-1 jest AHL i ze względu na specyficzność, jest wykorzystywany w komunikowaniu się wewnątrzgatunkowym. Natomiast AI-2 jest furanozolowym estrem kwasu borowego, wykrywanym u wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, który bierze udział w komunikowania się międzygatunkowym.

Systemy QS u bakterii kontrolują: luminiscencję, koniugację, ruch pełzający, sporulację, biokorozję, wytwarzanie bakteriocyn, antybiotyków, ekspresję czynników wirulencji, tworzenie biofilmu. Drobnoustroje poprzez QS zmieniają siebie w żywicielu poprzez wstrzymanie wytwarzania czynników wirulencji aż gęstość populacji dostatecznie „przytłoczy" układ obronny gospodarza.

2. System komunikacji między bakteriami i nowym celem terapeutycznym

Konwencjonalne metody, takie jak stosowanie antybiotyków i środków dezynfekcyjnych przynoszą ograniczony sukces w zapobieganiu lub leczeniu zakażeń. Ich częste, zwłaszcza nieracjonalne stosowanie, przyczynia się do powstawania oporności u drobnoustrojów. Stąd, istnieje potrzeba rozwoju alternatywnych strategii jak: leczenie fagami, stosowanie probiotyków, immunostymulantów i szczepionek oraz interferencja z QS.

Jednym ze sposobów interferencji z QS jest hamowanie biosyntezy cząsteczek sygnałowych, które ma

na celu zakłócenie QS. Wykazano, że analogi S-adenozylometioniny, tj. S-adenozylocysteina, S-adenozylohomocysteina i sinefungina mogą być potencjalnymi inhibitorami syntezy AHL u *Pseudomonas aeruginosa* [23]. Wynikiem ich działania jest spadek wytwarzania czynników wirulencji. W organizmach pro- i eukariotycznych możliwe jest użycie tych analogów jako specyficznych inhibitorów QS bez oddziaływania na inne procesy życiowe.

Należy podkreślić, że antybiotyki oprócz znaczenia ekologicznego, ewolucyjnego i terapeutycznego, mogą również interferować w komunikowanie się bakterii występujących w żywicielu [8].

Procesy fizjologiczne bakterii z udziałem QS są często powiązane z interakcjami z organizmem gospodarza. Organizmy wyższe posiadają mechanizmy, które niszczą QS. Jednym z nich jest wytwarzanie antagonistów QS – cząsteczek, które mogą wiązać regulatory odpowiedzi QS, ale nie uczynniają ich.

Czerwona alga australijska *Delisea pulchra* przyciągnęła uwagę biologów, ponieważ nie była skolonizowana przez bakterie, w przeciwieństwie do innych roślin obecnych w tym samym środowisku. Wytwarza ona co najmniej 30 różnych halogenowanych furanonów, które pełnią rolę antagonistów AHL pośredniczących w QS i najprawdopodobniej wiążą białka typu LuxR bez ich aktywacji [4]. Mechanizm ten chroni *D. pulchra* przed kolonizacją bakteryjną.

Z kolei Manefield i wsp. [20] wykazali, że śmiertelność krewetek *Penaeus monodon* zakażonych *V. harveyi* była niższa o 50% po domięśniowym podaniu rozcieńczonego ekstraktu supernatantu hodowli tych pałeczek prowadzonej w obecności halogenowanego furanonu.

Badania wskazują, że liczne bromowane furanony alg morskich zakłócają systemy QS bakterii Gramujemnych w stężeniach, które nie hamują wzrostu bakterii [12]. Występuje korelacja między strukturą i aktywnością bromowanych furanonów. Najważniejszy element strukturalny, bromek winylowy w pozycji δ połączony z pierścieniem bromowanego furanonu jest istotny w hamowaniu tworzenia biofilmu u *Escherichia coli*. Furanony mają zdolność penetracji biofilmów.

Givskov i wsp. [10] stwierdzili, że pełzający wzrost *Serratia liquefaciens* na podłożu agarowym może być zahamowany przez dodanie 100 mg/L (5*Z*)-4-bromo-5-(bromometyleno)-3-butylo-2(5H)-furanonu.

Niektóre naturalnie występujące molekuły AHL mogą stymulować wytwarzanie barwnika u *Chromobacterium vialaceum,* podczas gdy inne hamują ten fenotyp. Efekty te łączono ze strukturą acylowanego łańcucha bocznego cząsteczki AHL zawierającego do 8 atomów węgla i działającego jako agonista QS. AHL z acylowanym łańcuchem zawierającym 10 lub więcej atomów węgla działa jako antagonista QS. Zhu i wsp. [35] wykazali, że heterologiczne AHL są silnymi antagonistami AHL uczestniczącymi w QS u bakterii, które wydzielają białka typu LuxR. Nadprodukcja tych białek znosi represję. Badania Swift i wsp. [28] wskazują, że heterologiczne AHL są zdolne do zmniejszenia wytwarzania czynników wirulencji u *Aeromonas hydrophila* i *A. salmonicida*. Wytwarzanie proteazy serynowej przez *A. salmonicida* ulega obniżeniu do 50% po zastosowaniu laktonu *N*-(3-oksododekanoylo)-L-homoseryny w stężeniu 10 μM.

Syntetyczna pochodna chlorowcowanych furanonów *D. pulchra*, (5*Z*)-4-bromo-5-(bromometyleno)-2(5*H*)-furanon, jest najbardziej aktywnym antagonistą AHL opisanym dotychczas w piśmiennictwie. Ten furanon w stężeniu 10 μM prawie całkowicie redukuje ekspresję czynników wirulencji *P. aeruginosa* PA01 [14]. Jest aktywny wobec biofilmu bakterii i komórek wolnożyjących czyniąc je wrażliwymi na SDS i antybiotyki. Przy braku furanonu do eradykacji biofilmu utworzonego przez bakterie należałoby zastosować 100–1000-krotnie wyższe dawki antybiotyków niż w przypadku jego nieobecności [1]. Hentzer i wsp. [13] wykazali, że furanon jest także aktywny w tkance płucnej myszy po ich zakażeniu szczepem *P. aeruginosa.* Sygnał fluorescencji ze szczepu *P. aeruginosa* jest znacznie słabszy po podskórnym podaniu furanonu. Po 8 godzinach sygnał ponownie występuje wskazując, że furanon został usunięty z organizmu myszy.

Strukturę AI-2 opisali Chen i wsp. [3] dopiero w 2002 roku. Stąd też dotychczas przeprowadzono niewiele prób ingerujących w system QS z udziałem tego autoinduktora. Ren i wsp. [24] stwierdzili, że halogenowany furanon *D. pulchra* wcześniej opisany jako analog antagonistyczny AHL hamuje ruch pełzający *E. coli* regulowany przez AI-2. Furanon obniża grubość biofilmu *E. coli* do 55% i procent żywych komórek w biofilnie do 87%. Hamuje także luminiscencję u *V. harveyi* pośredniczoną przez AHL i AI-2 oraz może obniżać ekspresję niektórych czynników wirulencji tego patogenu.

Badania wskazują, że ekstrakty wielu gatunków roślin, m.in. grochu, ryżu, fasoli sojowej, ziemniaków, cieciorki pstrej i *Medicago truncatula* pobudzają lub hamują system QS zależny od AHL [9, 29]. Występuje kilka różnych AHL przypominających substancje obecne w ekstraktach grochu i sadzonkach *M. truncatula*, alg *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chl. mutablis*, *Chlorella vulgaris* i *Ch. fusca* [30], które stymulują QS u *V. harveyi* i *E. coli*.

3. Chemiczna inaktywacja cząsteczek sygnałowych quorum sensing

Cząsteczki AHL mogą być inaktywowane poprzez hydrolizę alkaliczną, w wyniku której powstają pochodne acylowane homoseryny oraz w reakcji z utle-

nionymi chlorowcami o aktywności przeciwdrobnoustrojowej [32]. Związki te w stężeniu 0,14 mM obniżają stężenie pochodnych AHL podstawione w pozycji 3-okso AHL do około ¼ po inkubacji przez jedną minutę [2]. Inaktywację 3-okso AHL wykazano w obecności składników polisacharydowych biofilmu.

W pH 6,0 molekuły 3-okso AHL reagują szybko z dwiema cząsteczkami bromowodorku lub kwasu podchlorawego, wytwarzając cząsteczkę 2,2-dihalo-3-okso AHL. Następnie, łańcuch acylowy jest hydrolizowany z wytworzeniem kwasu tłuszczowego i laktonu 2,2-dihalogeno-N-etanoylo-homeseryny. W pH 3 reakcja jest wstrzymywana po etapach halogenowania, podczas gdy w pH 8,0 – pierścień laktonu 2,2-dihalogeno-N-etanyolo-L-homeoseryny jest hydrolizowany. Dane te wskazują, że traktowanie hodowli wodą zawierającą niskie stężenia silnie utleniających czynników, takich jak ozon, może być użyteczne w leczeniu zakażeń poprzez usunięcie cząsteczek sygnałowych QS patogenu [27].

4. Enzymatyczna inaktywacja i biodegradacja cząsteczek quorum sensing

Zdolność degradacji AHL wśród bakterii jest rozpowszechniona w naturze. Enzymy zdolne do inaktywacji AHL wykryto u β-*Proteobacteria*, α-*Proteobacteria* i γ-*Proteobacteria*, jak i u bakterii Gram-dodatnich [5, 16, 18, 31, 34]. Bakterie te mogą blokować systemy QS konkurentów w celu uzyskania selektywnej przewagi nad nimi w danym ekosystemie. Inaktywacja cząsteczek sygnałowych QS może odbywać się z udziałem dwóch typów enzymów: laktonazy i acylazy AHL, które rozszczepiają pierścień laktonowy cząsteczek AHL sprawiając, że stają się one niezdolne do aktywacji pokrewnych regulatorów transkrypcyjnych. Acylazy wytwarzane przez *Eucaryota* mogą być również zdolne do inaktywacji AHL [33].

4.1. Bakteryjne laktonazy AHL

Pierwszego dowodu wskazującego, że inaktywacja enzymatyczna AHL może być użyta jako strategia w kontroli mikroorganizmów dostarczyli D o n g i wsp. [5], którzy badając ponad 500 szczepów bakteryjnych w celu oceny aktywności wobec AHL, wykazali obecność 24 szczepów o różnej aktywności enzymatycznej eliminującej AHL. Enzymy odpowiedzialne za aktywność inaktywującą AHL (AiiA) izolowano ze szczepu *Bacillus* spp. 240B1, który wykazywał najsilniejszą aktywność. Oczyszczony enzym w stężeniu 50 mg/L obniżał stężenie laktonu *N*-(3-oksoheksanoylo)-L-homoseryny po 10 minutach. Enzym AiiA hydrolizuje wiązania amidowe AHL.

Wykazano, że ekspresja enzymu AiiA *Erwinia carotovora* w roślinie transgenicznej obniża wytwarzanie enzymów degradujących ścianę komórkową przez patogen w około 10% i hamuje objawy choroby [6]. Z kolei M o l i n a i wsp. [21] oceniali skuteczność szczepu *Bacillus* spp. degradującego AHL wobec bakteryjnych chorób roślin. Zmniejszał on zakażenie u ziemniaków powodowane przez *E. carotovora* o 15%, a wywołane przez *Agrobacterium tumefaciens* o 10%. Degradacja AHL nie tylko ma działanie ochronne, ale także lecznicze. Podobne wyniki otrzymano w przypadku *Bacillus thuringiensis* [7, 17].

4.2. Bakteryjne acylazy AHL

D o n g i wsp. [5] odkryli szczep *Bacillus* spp. degradujący AHL, a L e a d b e t t e r i G r e e n b e r g [16] izolowali szczep *Variovorax paradoxus* VAI-C, który namnażał się na podłożu wzbogaconym 500 mg/l laktonu *N*-(3-oksoheksanoylo)-L-homoseryny jako źródle węgla i wodoru. Badacze wnioskowali, że *V. paradoxus* rozcina AHL za pomocą acylazy AHL, wyzwalając lakton homoseryny i kwas tłuszczowy.

L i n i wsp. [18] izolowali z biofilmu wielogatunkowego szczep *Ralstonia* spp. XJ12B inaktywujący AHL. Enzym odpowiedzialny za aktywność inaktywującą AHL nazwano AiiD. Ekspresja enzymu AiiD w transformowanym szczepie *P. aeruginosa* PA01 hamuje ruch pełzający tych pałeczek i zmniejsza śmiertelność zakażonych nicieni *Caenorhabditis elegans* o około 15% w porównaniu ze szczepem dzikim PA01.

4.3. Acylazy eukariotyczne

Ponieważ różne bakteryjne acylazy AHL mogą inaktywować AHL poprzez deacylację, X u i wsp. [33] badali zdolność odpowiednich enzymów eukariotycznych w celu inaktywacji cząsteczek AHL. Różne AHL są inaktywowane przez acylazę I nerki świni. Inaktywacja zachodzi w najwyższej wartości pH, co może być spowodowane alkaliczną hydrolizą pierścienia laktonu. Acylaza może zmniejszać tworzenie biofilmu wytwarzanego przez *Pseudomonas* spp. i *Microbacterium* spp. wskazując, że enzym ten może być zdolny do inaktywacji AHL w stężeniach występujących w warunkach naturalnych.

5. Zastosowanie agonistów quorum sensing

Wiele prób podejmowano w celu inaktywacji systemu QS regulującego ekspresję czynników wirulencji. M ä e i wsp. [19] badali strategię przeciwną: aktywowali sygnalizację QS regulującą ekspresję czynników wirulencji z zastosowaniem agonistów QS. Idea tej

strategii zakłada, że poprzez dodanie cząsteczek sygnałowych QS danego drobnoustroju ekspresja czynników wirulencji może być aktywowana przy niskiej gęstości populacji. Czynniki wirulencji mogą aktywować układ obronny gospodarza do rozwoju oporności. W swoich badaniach M ä e i wsp. [19] poprzez dodanie 5 mM roztworu AHL patogenu uzyskali zmniejszenie do 10% występowania choroby tytoniu powodowanej przez *E. caratovora.* Zdolność *E. caratovora* do wywołania zmian chorobowych po miejscowym podaniu 10^6 komórek patogenu/na roślinę zmniejsza się o 50% w transgenicznym tytoniu wytwarzającym AHL patogenu w porównaniu z linią dziką. Jeśli proces chorobowy jest wcześnie wykryty lub jeśli wielkość inokulum jest 4-krotnie wyższe, nie występują znaczące różnice między rośliną wytwarzającą AHL a kontrolą. Patogen w tych przypadkach jest obecny w wystarczająco dużej liczbie, aby pokonać system obronny rośliny. Wyniki te są zgodne z hipotezą, że QS jest wykorzystywany w celu uniknięcia przedwczesnego wytwarzania czynników wirulencji i aktywacji reakcji obronnej roślin.

6. Hormony ludzkie interferujące z quorum sensing

Badanie enterokrwotocznych *E. coli* (Enterohemorrhagic *E. coli* – EHEC) wykazały, że ludzkie hormony wzajemnie komunikują się z systemem QS [26]. System QS zależny od LuxS u EHEC kontroluje różne fenotypy, włączając patogenność i sekrecję typu III [25]. Sekrecja typu III i wytwarzanie czynników wirulencji są przywrócone u mutanta *luxS* przez dodanie hormonów ludzkich: adrenaliny i noradrenaliny.

Traktowane komórki antagonistami w stosunku do receptorów adrenergicznych (receptory hormonalne w ludzkiej błonie komórkowej) blokują wzajemną aktywację luxS mutanta przez ludzkie hormony. S p e r a n d i o i wsp. [26] także sugerują obecność trzeciego typu autoinduktora, AI-3, który jest zależny od systemu *luxS*. Proponują oni, że geny u szczepów EHEC są regulowane przez sygnały AI-3/adrenalina-noradrenalina, co może wpływać na proces zakażenia poprzez skoordynowanie czasu i warunków rozwoju wirulencji.

7. Inne metody niszczenia quorum sensing

W ostatnich latach wyłaniają się firmy, zajmujące się produkcją leków anty-QS i anty-biofilm. Ponieważ celem dla tych leków są bakteryjne systemy regulatorowe zawiadujące ekspresją czynników wirulencji, określa się je mianem leków antypatogennych. Inhibitory QS mogłyby stworzyć nową generację leków antybakteryjnych przydatnych w wielu dziedzinach, w tym w medycynie, weterynarii, rolnictwie, produkcji żywności i w przemyśle wodnym.

Innym sposobem hamowania wiązania cząsteczek AHL z receptorem jest zastosowanie specyficznych przeciwciał. Cząsteczki AHL dyfundujące do środowiska zewnątrzkomórkowego mogłyby zostać związane przez przeciwciała, co uniemożliwiłoby ich wejście do komórki bakteryjnej i aktywację regulatorów transkrypcyjnych.

Powstał również pomysł zastosowania antysensownych oligonukleotydów, które wiązałyby się specyficznie z transkryptami kaskady QS i hamowały ekspresję genów [11, 15]. Badania przeprowadzone u *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* i *E. coli* wykazały, że antysensowne oligonukleotydy mogą specyficznie wiązać się z celowanymi transkryptami i hamować ekspresję genową. Leczenie antysensowne wydaje się być o tyle korzystne, że regulacja antysensowna jest powszechnym zjawiskiem występującym u bakterii. Skuteczność tej techniki nie została dotąd dobrze oceniona.

8. Ograniczenia zniszczenia bakteryjnego quorum sensing

8.1. Rozwój oporności

Pierwszym ograniczeniem zastosowania technik niszczących QS jako nowej strategii przeciw zakażeniom może być rozwój oporności. Badania Z h u i wsp. [35] wskazują, że bakterie mogą blokować QS przez nadprodukcję genów QS. Liczne syntetyczne analogi AHL stanowią silne inhibitory odpowiedzi QS u dzikich szczepów *Agrobacterium tumefaciens*, podczas gdy w transformowanym szczepie *A. tumefaciens*, który nadprodukował TraR – homolog LuxR – inhibicji nie wykrywano dla innych analogów. Zniszczenie QS prawdopodobnie nie sprzyja presji selektywnej doprowadzającej do rozwojowi oporności, jak to stwierdza się w przypadku konwencjonalnych leków przeciwdrobnoustrojowych [13, 14]. Powstające zmiany u mutantów QS mogą być raczej niewielkie.

7.2. Brak specyficzności

Niezależnie od rozwoju oporności, brak specyficzności może także ograniczać użycie metod zakłócających QS. Może dojść do inaktywacji szerokiego zakres cząsteczek sygnałowych AHL. Zatem większość metod niszczących systemy QS opiera się na niespecyficznym blokowaniu systemu QS jednego lub więcej drobnoustrojów. Na podstawie dostępnej wiedzy należy uwzględnić fakt, że nie wszystkie bakterie,

które korzystają z systemów QS są patogenami. Zakłócenie bądź zniszczenie QS może oddziaływać odwrotnie lub w sposób nieznany wobec oczekiwań. Może sprzyjać lub utrudniać procesy regulowane przez QS w różnych ekosystemach. Wprowadzenie technik, które tylko będą niszczyły system QS jednego patogennego gatunku może być trudne.

8. Podsumowanie

Wyniki otrzymane z zastosowaniem metod, które niszczą system QS bakterii patogennych wskazują, że są one obiecującą alternatywą przy braku skuteczności antybiotyków w zwalczaniu zakażeń. Badania dotyczące systemu QS pozostają jeszcze na etapie poznawania mechanizmów, poprzez które system QS jest regulowany, aktywowany i hamowany. Większość badań dotyczy QS z udziałem AHL patogenów Gramujemnych ludzi i roślin. W przyszłości należałoby poszukiwać metod umożliwiających niszczenie systemów QS innych drobnoustrojów.

Przed wprowadzeniem tej nowej strategii trzeba rozważyć zagadnienia, którym należałoby sprostać. Oddziaływanie zniszczonego systemu QS różnych drobnoustrojów na ich wirulencję powinno być dokładnie badane w celu wyjaśnienia, czy jest to skuteczna strategia w zapobieganiu zakażeniom. Różne metody niszczące QS powinny być szeroko badane celem określenia, które z nich są najbardziej odpowiednie do zastosowania w określonym ekosystemie. Do oceny pozostaje wpływ niszczenia systemu QS na zdrowie chorych, ostatecznych konsumentów produktów żywnościowych. Należy uwzględnić, że zniszczenie QS może oddziaływać przeciwnie niż oczekuje się, w nieznany jeszcze sposób, faworyzujący zjawiska podlegające regulacji przez ten złożony mechanizm. Przeanalizowania wymagają problemy natury praktycznej, takie jak koszty leczenia oraz sposób dostarczenia komponentu niszczącego QS do miejsca jego działania. Nie należy pomijać problemu ewentualnego rozwoju oporności, choć uważa się, że związki niszczące QS są mniej prawdopodobnymi czynnikami selektywnymi w rozwoju oporności niż konwencjonalne czynniki przeciwdrobnoustrojowe.

Piśmiennictwo

1. Anwar H., Costerton J.W.: Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1666–1671 (1990)
2. Borchardt S.A., Allain E.J., Michels J.J., Stearns G.W., Kelly R.F., McCoy W.F.: Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3174–3179 (2001)
3. Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dosselaer A., Pelczer I, Bassler B.L., Hugson F.M.: Structural identification of a bacterial quorum sensing containing boron. *Nature*, **415**, 545–549 (2002)
4. de Nys R., Steinberg P., Rogers C.N., Charlton T.S., Duncan M.W.: Quantitative variation of secondary matabolites in the sea hare *Apylsia parvula* and its host plant, *Delisea pulchra. Mar. Ecol. Prog. Ser.* **130**, 135–146 (1996)
5. Dong Y.H., Gusti A.R., Zhang Q., Xu J.L., Zhang L.H.: Identification of quorum quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1754–1759 (2000)
6. Dong Y.H., Xu J.L., Li X.Z., Zhang L.H.: AiiA, an enzyme that inactives the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Ervinia carotovora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3526–3531 (2002)
7. Dong Y.H., Zhang X.F., Xu J.L., Zhang L.H.: Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 954–960 (2004)
8. Fajero A., Mortinez J.L.: Antibiotics as signal that trigger specific bacterial responses. *Curr. Opinion Microbiol.* **11**, 161–167 (2008)
9. Gao M., Teplitzki M., Robinson J.B., Bauer W.D.: Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant-Microb. Interact*. **16**, 827–834 (2003)
10. Givskov M., de Nys R., Manefield M., Gram L., Maximilien R., Eberl L., Molin S., Steinberg P.D., Kjelleberg S.: *Eucaryota* interference with homoserine lactone – mediated prokaryotic signaling. *J. Bacteriol*. **178**, 6618–6622 (1996)
11. Good L., Awasthi S.K., Dryselius B., Larsson O., Nielsen P.: Bacteriocidal antisense effect of peptide-PNA conjugates. *Nat. Biotechnol*. **19**, 360–364 (2001)
12. Han Y., Hou S., Simon K.A., Ren D., Luk Y.Y.: Identifying the important structural elements of brominated furanones for inhibiting biofilm formantion by *Escherichia coli*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 1006–10010 (2008)
13. Hentzer M., Eberl L., Nielsen J., Givskov M.: Quorum sensing, a novel target for the treatment of biofilm infections. *Biodrugs*, **17**, 241–250 (2003)
14. Hentzer M., Givskov M. i wsp.: Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* **22**, 3803–38–15 (2003) (cytowana praca jest dziełem 15 autorów)
15. Ji Y., Zhang S.F., Horn, Warren P., Woodnutt M.K., Rosenberg M.: Identification of critical *Staphylococcus* genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science*, **293**, 2266–2269 (2001)
16. Leadbetter J.R., Greenberg E.P.: Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* **182**, 6921–6926 (2000)
17. Lee S.J., Park S.Y., Lee J.J., Yum D.Y., Koo B.T., Lee J.K.: Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol*. **68**, 3919–3924 (2002)
18. Lin Y.H., Xu J.L., Hu J., Wang L.H., Ong S.L., Leadbetter J.R., Zhang L.H.: Acyl homoserine lactone acylase from *Ralstonia* sp. Strains XJI2B represents a novel and potent class of quorum quenching enzymes. *Mol. Microbiol*. **47**, 849–860 (2003)
19. Mäc A., Montesano M., Koiv V., Palva E. T.: Transgenic plants producing the bacterial pheromone *N*-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phyto-

pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microb. Interact*. **14**, 1035–1042 (2001)
20. Manefield M., Harris L., Rice S.A., de Nys R., Kjelleberg S.: Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**, 2079–2084 (2000)
21. Molina L., Constrantinescu F., Michel L., Reimmann C., Duffy B., Defago G.: Degradation of pathogen quorum sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Ecol*. **45**, 71–81 (2003)
22. Nealson K.H., Platt T., Hastings J.W.: Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol*. **104**, 313–322 (1970)
23. Parsek M.R., Greenberg E.P.: Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: a sinaling involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl*. *Acad. Sci. USA*, **97**, 8789–8793 (2000)
24. Ren D., Sims J.J., Wood T.K.: Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5*Z*)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ. Microbiol.* **3**, 731–736 (2001)
25. Sircili, M.P., Walters M., Trabulsi L.R., Sperandio V.: Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect. Immun.* **72**, 2329–2337 (2004)
26. Sperandio, V., Torres A.G., Jarvis B., Nataro J.P., Kaper J.B.: Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8951–8956 (2003)
27. Summerfelt S.T.: Ozonation and UV irradiation-an introduction and examples of current applications. *Aquac. Eng*. **28**, 21–36 (2003)
28. Swift S., Lynch M.J., Fish L., Kirke D.F., Tomas J.M., Stewart G.S., Williams P.: Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun*. **67**, 5192–5199 (1999)
29. Teplitski M., Robinson J.B., Bauer W.D.: Plants secrete substance that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **13**, 637–648 (2000)
30. Teplitski M., Cen H., Rajamani S., Gao M., Merighi M., Sayre R.T, Robinson J.B., Rolfe B.R., Bauer W.D.: *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria. *Plant Physiol*. **134**, 137–146 (2004)
31. Uroz S., D'Angelo-Picard C., Carlier A., Elasri M., Sicot C., Petit A., Oger P., Faure D., Dessaux Y.,: Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated fuctions of plant-phatogenic bacteria. *Microbiology*, **149**, 1981–1989 (2003)
32. Voelkert E., Grant D.R.: Determination of homoserine as the lactone. *Anal. Biochem*. **34**, 131–137 (1970)
33. Xu F., Byun T., Dussen H. J., Duke K.R.: Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum sensing molecules, by acylase. *J. Biotechnol*. **101**, 89–96 (2003)
34. Zhang H.B., Wang L.H., Zhang L.H.: Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Aced. Sci. USA*, **99**, 4638–4643 (2002)
35. Zhu J., Beaber J. W., More M.L., Fuqua C., Eberhard A., Winans S.C.: Analogs of the audoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the RraR protein of *Agrobacterium tumefacirns*. *J. Bacteriol*. **180**, 5398–5405 (1998)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 371–378
http://www.pm.microbiology.pl

ALTERNATYWNE DO ANTYBIOTYKOTERAPII SPOSOBY ERADYKACJI BIOFILMÓW

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Barbara Różalska*, Elżbieta Walencka

Zakład Biologii Zakażeń, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii i Immunologii
Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, tel. (42) 635 44 72
* Autor korespondencyjny: e-mail: rozab@biol.uni.lodz.pl

1. Wstęp. 2. Naturalne produkty o działaniu przeciwbakteryjnym. 2. 1. Antagonistyczne produkty drobnoustrojów. 2. 2. Peptydy bójcze komórek eukariotycznych. 3. Fitozwiązki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. 4. Konkurencja makroorganizmu i drobnoustrojów o mikroelementy. 5. Podsumowanie

Anti-biofilm therapy – an alternative to antibiotics

Abstract: Frequent failures in the treatment of infections, including those associated with the use of biomaterials, do not allow to be optimistic about the perspectives of therapy with antibiotics. It is estimated that biofilms, which are the most common factor responsible for such infections, can demonstrate even 500–1000 fold higher drug resistance than dispersed populations of a given species of bacteria. A relatively slow development of new antibiotics, observed in the last 2–3 decades, suggests a need for looking for a new approach in anti-infectious therapy, alternative to the therapy with antibiotics. There is an increasing interest in applying natural components of the plant and animal immune systems. The advantage of such products could be the fact that they act irrespective of the drug-sensitivity profile and the preferred phenotype (sessile or planktonic) of a given microorganism as well as present only minimum risks of generating resistance. Nowadays, the discovery of new agents that wpuld increase the effectiveness of anti-biofilm therapy is a challenge for medicine and mircrobiology.

1. Introduction. 2. Natural antimicrobial products. 2.1. Antagonistic microbe-derived products. 2. 2. Eukaryotic cell-derived peptides. 3. Antimicrobial phytochemicals. 4. Host-microbes competition for microelements. 5. Summary

Słowa kluczowe: biofilm, biosurfaktanty, chelatory jonów metali, fitozwiązki, peptydy przeciwdrobnoustrojowe
Key words: biofilm, biosurfactants, metal chelators, phytochemicals, antimicrobial peptides

1. Wstęp

Mając na uwadze naturalną i powszechną skłonność drobnoustrojów do tworzenia wielowarstwowych skupisk komórek zwanych biofilmem, kilkanaście lat temu postawiono pytanie, czy patogeneza niektórych zakażeń u ludzi ma związek z tworzeniem takich struktur. Pytanie to wydało się ważne, szczególnie w odniesieniu do zakażeń o charakterze przewlekłym, trudnych lub niemożliwych do wyleczenia. Później, istotnie potwierdzono zdolność do tworzenia biofilmu przez drobnoustroje izolowane z określonych przypadków zakażeń, w tym często towarzyszących stosowaniu inwazyjnych procedur medycznych. Pozwoliło to na uznanie biofilmu, rozwijającego się na powierzchni uszkodzonej tkanki lub biomateriału urządzeń medycznych, za strukturę biologiczną odpowiedzialną za specyficzny charakter takich zakażeń. Dane epidemiologiczne wskazują, iż wśród najczęściej izolowanych czynników etiologicznych „trudnych" zakażeń znajdują się gronkowce: *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*, paciorkowce, pałeczki Gram-ujemne: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* oraz grzyby drożdżopodobne, głównie z rodzaju *Candida.* Jak stwierdzono w licznych badaniach *in vitro* oraz wykazano na modelach zakażeń eksperymentalnych u zwierząt, wszystkie z tych drobnoustrojów szybko i łatwo tworzą biofilmy. Nawet, gdy takie zakażenie rozwija się u osobnika ze sprawnie działającym układem odpornościowym, nie zawsze jego aktywność doprowadza do eradykacji drobnoustrojów. Terapia antybiotykami przynosi wprawdzie okresową poprawę stanu klinicznego, eliminując uwalniane drobnoustroje planktoniczne, ale nie niszczy całej struktury biofilmu. Tak więc, cechą charakterystyczną infekcji, u podłoża której leży tworzenie biofilmu jest najczęściej brak możliwości eradykacji zakażenia [8, 16, 18, 28].

Od lat rozwijają się nowe kierunki badawcze nad alternatywnymi strategiami zwalczania biofilmów. Ich główne cele ukierunkowane są na blokowanie kolejnych etapów procesu powstawania biofilmu i zakładają m.in. [9, 21, 24, 27, 30, 32, 34, 42]:

- zapobieganie adhezji bakterii poprzez łączenie z powierzchnią biomateriału czynników przeciwbakteryjnych,
- blokowanie powstawania/działania mediatorów komunikacji międzykomórkowej (inhibitory *quorum sensing*),
- hamowanie namnażania drobnoustrojów przez zastosowanie antybiotyków w monoterapii cyklicznej lub terapii skojarzonej z nieantybiotykowymi produktami biobójczymi,
- blokowanie powstawania substancji zewnątrzkomórkowej (EPS),
- niszczenie EPS i całej struktury biofilmu przez zastosowanie enzymów litycznych, surfaktantów, bakteriofagów i innych.

2. Naturalne produkty przeciwbakteryjne

Liczne niepowodzenia w leczeniu zakażeń, w tym towarzyszących wykorzystaniu biomateriałów, nie pozwalają na nadmierny optymizm w kwestii perspektyw antybiotykoterapii. Szacuje się bowiem, iż biofilmy będące najczęstszą przyczyną takich zakażeń mogą wykazywać nawet 500–1000-krotnie wyższą lekooporność niż populacje rozproszone danego gatunku bakterii. Niewielki w ostatnich dekadach postęp w opracowaniu i wprowadzeniu do lecznictwa nowych antybiotyków, uzasadnia zwrot w kierunku poszukiwania alternatywnych do antybiotykoterapii sposobów zwalczania zakażeń. Coraz częściej rozważa się wykorzystanie naturalnie istniejących produktów wchodzących w skład układu obronnego roślin i zwierząt. Ich zaletą może być działanie niezależne od reprezentowanego profilu lekowrażliwości i preferowanego fenotypu (osiadłego lub planktonicznego) danego drobnoustroju i znikome zagrożenie generowania mechanizmów oporności.

Znalezienie sposobu na podniesienie efektywności terapii przeciwbiofilmowej stanowi wyzwanie nowoczesnej medycyny i mikrobiologii. Ważnym nurtem dociekań naukowych w tym zakresie jest badanie możliwego synergistycznego działania znanych „starych" antybiotyków i produktów naturalnych. Podejmowane są np. badania nad zastosowaniem, oddzielnie lub łącznie z antybiotykami, produktów bakteryjnych i grzybowych, takich jak enzymy lityczne, bakteriocyny, biosurfaktanty oraz licznych substancji wywodzących się z grupy eukariotycznych peptydów i białek przeciwdrobnoustrojowych [12, 21, 23, 32].

2.1. Antagonistyczne produkty drobnoustrojów

Jednym z bogatych źródeł skutecznych czynników biobójczych wydają się być same mikroorganizmy. Oddziaływania o charakterze antagonistycznym między drobnoustrojami wynikają zazwyczaj z potrzeby ich konkurowania o zasiedlaną niszę. W kategorii czynników antybiotycznych znajdują się produkty białkowe o aktywności enzymów litycznych, bakteriocyny a także biosurfaktanty. Analiza danych piśmiennictwa dotyczącego możliwości niszczenia biofilmu z zastosowaniem enzymów litycznych produkowanych przez drobnoustroje, wskazuje na dwa równoległe nurty badań prowadzonych w tym zakresie. W jednym z nich rozważa się zasadność użycia enzymów litycznych, których punktem docelowym jest ściana komórkowa bakterii (np. lizostafina). W drugim, przedmiotem badań są enzymy niszczące glikokaliksową macierz biofilmu lub substancje będące inhibitorami enzymów bakteryjnych uczestniczących w biosyntezie ściany komórkowej lub substancji zewnątrzkomórkowej. Przykładem enzymu aktywnego wobec struktur ściany komórkowej np. gronkowców, oprócz dobrze znanej lizostafiny, jest endopeptydaza produkowana przez *P. aeruginosa* – Las A proteaza (stafylolizyna). Innym enzymem, od niedawna branym pod uwagę w wykorzystaniu przeciwko bakteriom osiadłym w biofilmie jest dyspersyna B wytwarzana przez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* – hydrolaza glikozydowa, która posiada zdolność niszczenia np. egzopolisacharydu gronkowców [6, 21].

Wiadomo, że wśród istotnych strategii ograniczania adhezji drobnoustrojów do powierzchni przyrządów medycznych, znajduje się wprowadzanie do struktury polimeru czynników zmniejszających jego hydrofobowość lub ładunek powierzchniowy. Substancje o pożądanych właściwościach w tym zakresie określane są jako surfaktanty. Obok dotępnych komercyjnie syntetycznych surfaktantów, te naturalnie wytwarzane są najbardziej atrakcyjne. Wytwarzane są przez różne drobnoustroje, mają różną strukturę chemiczną oraz odmienne funkcje dla komórek producenta. Grupa naturalnych związków obejmuje niskocząsteczkowe czynniki obniżające napięcie powierzchniowe i fazowe oraz wielkocząsteczkowe polimery, wiążące się silnie z powierzchnią. Pod względem chemicznym, niskocząsteczkowe biosurfaktanty to glikolipidy (ramnolipid *Pseudomonas*), lipopeptydy (surfaktyna *Bacillus subtilis*), peptydy (gramicydyna S *B. brevis* i polimyksyna B *B. polimyxa*) lub peptydolipidy (wiskozyna *Pseudomonas*). Obok zwiększania dostępności danej powierzchni dla komórek drobnoustrojów lub dostępności metabolicznych substratów nierozpuszczalnych w wodzie, biosurfaktanty mogą wykazywać bezpośrednią aktywność przeciwdrobnoustrojową. Kilka surfaktantów lipopeptydowych stanowi potencjalne antybiotyki; np. cykliczne lipopeptydy *B. subtilis* (surfaktyna lub subtilizyna), zewnątrzkomórkowy peptyd – streptofaktyna *Streptococcus tendae* i dekapeptyd – gramicydyna S *B. brevis* oraz polimyksyny produkowane przez *B. polimyxa* i pokrewne laseczki. Inną, znaczącą rolę odgrywają biosurfaktanty w regulacji oddziaływania mikroorganizmów z powierzchnią, ułatwiając ich przyleganie lub odłączanie. Z kolei, spadek hydrofobowości powierzchni *P. aeruginosa* następuje wraz ze wzrostem syntezy ramnolipidu. Hydrofobowość powierzchni szczepów *Acinetobacter* także ulega redukcji pod wpływem obecności powierzchniowego emulgatora. Podobną rolę mogą pełnić także biosurfaktanty innych drobnoustrojów, których produkcja odbywa się podczas fazy stacjonarnej wzrostu, a ostatnie doświadczenia potwierdzają, iż jest ona zależna od funkcjonowania systemu komunikacji międzykomórkowej – *quorum sensing* (QS). Wynika z tego, że same mikroorganizmy pokazują, w jaki sposób, zgodnie z określoną potrzebą, regulacja hydrofobowości ich

struktur powierzchniowych zapewnia im przyleganie lub odrywanie od danej powierzchni. Należy zauważyć, że właśnie z tego typu zjawiskami mamy do czynienia podczas kolejnych etapów tworzenia, dojrzewania i starzenia się biofilmów, zarówno w warunkach zdrowia, jak i choroby. Nie dziwi więc zainteresowanie biosurfaktantami, w kontekście ich zastosowania w medycynie do zwalczania biofilmów patologicznych [5, 11, 29, 32].

Zamierzony, destrukcyjny wpływ na strukturę biofilmu obserwowano w badaniach prowadzonych w wielu ośrodkach dla surfaktantów produkowanych przez *Lactobacillus* sp., *B. subtilis*, *Streptococcus* sp., *Candida antarctica*. Próby wykorzystania biosurfaktantów do hamowania adhezji drobnoustrojów patogennych do powierzchni potwierdziły, iż np. surfaktyna *B. subtilis* obniża kolonizację cewników i studzienek mikropłytek wykonanych z chlorku poliwinylu przez różne bakterie, a surfaktanty *L. acidophilus* hamują tworzenie biofilmu na cewnikach urologicznych przez patogeny dróg moczowych i drożdże. Potwierdzono także doświadczalnie hamowanie tworzenia biofilmu *in vitro* i *in vivo* przez substancje powierzchniowo czynne produkowane przez *L. fermentum*. W tym kontekście, niezwykle interesująco przedstawiają się obserwacje Espinosa-Urgel [14] oraz Davey i wsp. [11], dotyczące roli ramnolipidu – surfaktantu *P. aeruginosa*. Wykazano jego rolę, nie tylko w utrzymywaniu określonego ładu przestrzennego złożonej architektury biofilmu, ale także funkcję „strażnika" chroniącego własny biofilm przed współzasiedleniem mikroflorą konkurencyjną. Co więcej, okazało się, że ramnolipid odgrywa inną istotną rolę w patogenezie zakażeń z udziałem tego drobnoustroju, tj. w hamowaniu aktywności leukocytów penetrujących miejsce utworzonego biofilmu. Wydaje się więc, że ingerencja w produkcję ramnolipidu, podlegającej kontroli przez system *quorum sensing*, może być sposobem na przezwyciężenie ograniczenia możliwości eradykacji biofilmu *P. aeruginosa* [11, 14, 29, 32]. W badaniach własnych wykazano wysoką skuteczność anty-adhezyjną i anty-biofilmową surfaktantu otrzymanego z przesączu hodowli *L. acidophilus* oraz mannoproteiny wyekstrahowanej ze ściany komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [39, 40].

2.2. Peptydy bójcze komórek eukariotycznych

Mechanizmy odporności nieswoistej zwierząt i człowieka obejmują obok barier fizycznych także produkcję przeciwbakteryjnych białek i peptydów kationowych, jak lizozym, laktoferyna, defensyny, katelicydyny i in. Z uwagi na powszechność występowania i skuteczność działania, rozważane jest użycie niektórych z nich w pomocniczej terapii zakażeń. Wiadomo, że główną część odporności nieswoistej wrodzonej stanowią defensyny, odpowiadające za pierwszą linię obrony przeciwko wnikającym patogenom oraz podnoszenie skuteczności odpowiedzi humoralnej. Charakterystyczną cechą są ich właściwości „bakteriocynowe", bowiem oddziałują one z negatywnie naładowanymi lipidami na powierzchni bakterii, grzybów lub wirusów, czego efektem jest cytoliza drobnoustrojów [12, 15, 33]. Niestety, wiele z tych peptydów nie jest w pełni skutecznych w niszczeniu niektórych groźnych patogenów, a szczególnie struktury ich dojrzałego biofilmu. Wprawdzie, dzięki dodatniemu ładunkowi i hydrofobowym właściwościom, peptydy łatwo osiągają powierzchnię osłon komórkowych bakterii naładowanych ujemnie. Ale mechanizm oporności drobnoustrojów na działanie defensyn polega, np. u *S. aureus* właśnie na modyfikacji struktury ściany i błony komórkowej prowadzących do zmiany ładunku. W przypadku *S. aureus*, może to wynikać ze zmian w strukturze kwasów tejchojowych, modyfikowanych przez dodanie D-alaniny i N-acetylo-glukozaminy. Podobny efekt może zależeć od pojawienia się w błonie komórkowej *S. aureus* dodatnio naładowanego, „lizynowanego" fosfatydyloglierolu (L-PG), jako produktu syntazy lizynofosfatydylo-glicerolowej (MprF), kodowanej przez gen *mprF.* Homologi genu *mprF* warunkującego oporność na wiele peptydów przeciwbakteryjnych znaleziono także u innych drobnoustrojów, np. u *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Agrobacterium tumefacjens*. Mechanizm taki nie stanowi jednak przyczyny większej oporności *S. epidermidis* i innych gronkowców koagulazo-ujemnych, które zawierają lizynofosfoglicerol w ilości znacznie mniejszej niż *S. aureus*. Mechanizm oporności wobec peptydów kationowych u *S. epidermidis* związany jest raczej z produkcją kwasu poly-γ-glutaminowego (PGA), kodowanego przez geny *cap* o podobnej funkcji u *B. anthracis* i *B. subtilis*. Ostatnie badania wskazują, że geny *cap* ulegają nadekspresji w strukturze biofilmu, dowodząc znaczenia ich produktów w wysokiej oporności biofilmu na działanie różnych czynników odporności nieswoistej [12].

Ostatnio wzrasta zainteresowanie innym przeciwbakteryjnym peptydem kationowym – indolicydyną, pierwotnie izolowanym z ziarnistości neutrofilów bydlęcych. Obecnie wiadomo, iż występuje także u innych kręgowców, bezkręgowców i roślin. Indolicydyna posiada masę cząsteczkową ok. 4 kDa, zaliczana jest więc do grupy najmniejszych istniejących peptydów przeciwbakteryjnych. Peptyd ten przedstawia unikatowy skład aminokwasowy, posiada bowiem największą zawartość tryptofanu (5 reszt) wśród wszystkich znanych peptydów, a aż 3 z pozostałych 8 aminokwasów to podjednostki proliny. Obecność takiego składu determinuje silnie hydrofobowy charakter peptydu oraz jego dodatni ładunek. Uważa się, że skład

aminokwasowy oraz plastyczność tego liniowego peptydu może mieć istotne znaczenie dla jego aktywności biologicznej. Indolicydyna wykazuje szeroki zakres działania bójczego zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, jak i grzybów czy pierwotniaków. Mechanizm działania indolicydyny jest zależny od stężenia peptydu; wysokie umożliwia wbudowywanie i akumulację w błonie komórkowej oraz zaburzanie jej potencjału membranowego, prowadzące do lizy komórki. Ponadto, według danych piśmiennictwa, indolicydyna i jej syntetyczne pochodne są przykładem peptydów nie tylko o unikalnym składzie, ale i szerszym niż inne peptydy zakresie działania przeciwbakteryjnego. Poza zaburzaniem ciągłości błony cytoplazmatycznej, wykazują także negatywny wpływ na strukturę białek, RNA i DNA, a więc i ich funkcję [12]. W badaniach własnych wykazano, iż mechanizm działania indolicydyny pozwala nie tylko na bezpośrednią aktywność bójczą wobec gronkowców, ale także na uzyskanie efektu synergistycznego w łącznym użyciu z oksacyliną. Niestety, indolicydyna, podobnie jak wcześniej wspomniane inne „eukariotyczne" peptydy kationowe, nie wykazuje znaczącej aktywności zarówno wobec biofilmu tworzonego przez szczepy *S. aureus* jak i przez *S. epidermidis*. Niewykluczone, że nagromadzenie w masie biofilmu różnorodnych produktów metabolizmu o znaczeniu „anty-stresowym" oraz dużej ilości proteaz może być jedną z przyczyn (manuskrypt w przygotowaniu).

Z kolei, inne znane peptydy – lizozym i laktoferyna, należą do kategorii dużych peptydów kationowych, które ulegają ekspresji w gruczołach podśluzówkowych, neutrofilach i makrofagach (tylko lizozym), gdzie mogą być przechowywane a następnie wydzielane podczas reakcji zapalnej. Lizozym (muramidaza), należy do grupy enzymów o silnych właściwościach bakteriolitycznych. Hydrolizuje wiązania w obrębie β-1,4 glikozydowych mostków tlenowych pomiędzy podjednostkami glikanowymi, tworzonymi przez kwas N-acetylomuramidowy i N-acetyloglukozaminę. Powoduje to wzrost przepuszczalności osłon komórkowych oraz prowadzi do zaburzeń ich prawidłowej struktury i funkcji. Działanie lizozymu jest niespecyficzne, dzięki czemu wykazuje on szerokie spektrum aktywności wobec szeregu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. U ssaków lizozym występuje w moczu, ślinie, łzach, mleku, śluzie szyjkowym, leukocytach i w różnych stężeniach w poszczególnych tkankach: wątrobie, chrząstkach stawowych i nerkach, gdzie pełni funkcje ochronne. Mimo tak szerokiego występowania i wielokierunkowej aktywności lizozymu notuje się powszechną oporność drobnoustrojów na jego działanie. Tłumaczy się ten fakt, między innymi złożonością budowy peptydoglikanu, która często uniemożliwia kontakt enzymu z miejscem docelowego działania. Z kolei, modyfikacje struktury peptydoglikanu, poprzez *O*-acetylację kwasu *N*-acetylomuraminowego lub deacetylację *N*-acetyloglukozaminy, są kolejną przyczyną oporności bakterii na muramidazę. Np. u bakterii z gatunku *S. aureus* oporność na działanie lityczne lizozymu, związana z procesem *O*-acetylacji występuje u 35–90% izolatów gronkowców, pomimo znanej ogólnej wrażliwości bakterii Gram-dodatnich na aktywność przeciwbakteryjną tego enzymu [12, 33].

Laktoferyna, białko o dużym powinowactwie do żelaza należące do rodziny transferyn, obecna jest w mleku i wydzielinach śluzowych oraz ziarnach granulocytów. Występuje w formie wolnej (apolaktoferyna) lub związanej z cząsteczkami żelaza (hololaktoferyna), przy czym uważa się, iż za działanie przeciwbakteryjne odpowiedzialna jest pierwsza forma. Zasadniczy mechanizm działania laktoferyny polega na wiązaniu żelaza niezbędnego do wzrostu bakterii, co powoduje blokowanie jego dostępności i tworzenie środowiska bakteriostatycznego. Inny mechanizm polega na oddziaływaniu na błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych, prowadzącym do jej destabilizacji i lizy. Za ten typ działalności odpowiada silnie kationowa N-końcowa część białka, bogata w podjednostki argininy, określana jako laktoferycyna. Laktoferyna zwiększa ponadto działanie przeciwbakteryjne lizozymu i niektórych antybiotyków oraz blokuje aktywność katalityczną żelaza w tworzeniu wolnych rodników hydroksylowych podczas reakcji Haber-Weissa. Ostatnio zaobserwowano także działanie przeciwbiofilmowe laktoferyny wobec *P. aeruginosa*, polegające na osłabieniu zdolności bakterii do kolonizacji i tworzenia mikrokolonii, w wyniku wywołanej zwiększonej aktywności motorycznej tych bakterii [4, 35, 41]. Temat rozważań dotyczących, nie tyle bezpośredniej roli biobójczej (niestety mało skutecznej) laktoferyny, co możliwości jej wpływu na rozwój i utrzymanie się stabilnej struktury biofilmów, poprzez „manipulację" w poziom dostępnych jonów żelaza jest niezwykle interesujący i perspektywiczny. Wątek ten zostanie rozwinięty w podrozdziale 4 niniejszego opracowania.

Jedną z propozycji przeciwdziałania lekooporności drobnoustrojów jest połączenie działania litycznego lizozymu i chelatującego laktoferyny wraz z antybiotykami. Synergizm tych naturalnych substancji przeciwdrobnoustrojowych może zwiększyć skuteczność powszechnie stosowanych antybiotyków, prowadząc do obniżenia wartości MIC antybiotyku wobec biofilmu, wobec komórek uwolnionych z biofilmu lub komórek z hodowli zawiesinowych. Inną przyczyną wzrostu zainteresowania naturalnymi peptydami o aktywności przeciwdrobnoustrojowej jest możliwość i łatwość ich syntezy *de novo*, modyfikacji lub połączenia z innymi cząsteczkami tak, aby wykazywały

działanie bójcze bardziej skuteczne i w dodatku ukierunkowane na określony drobnoustrój. Tego typu strategia modyfikacji naturalnych peptydów może pozwolić, nie tylko na podniesienie ich aktywności, ale również na ograniczenie niepożądanych efektów ubocznych obserwowanych podczas terapii antybiotykami (niszczenie naturalnej mikroflory, generowanie szczepów opornych). Cząsteczki o wybiórczej aktywności bójczej nazwano STAMPs (ang. Specifically targeted antimicrobial peptides). Otrzymuje się je dokonując fuzji regionu peptydu o wąskim zakresie działania z regionem innego peptydu wykazującego szerszą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Wysoce specyficzny, wybiórczo działający region takiego fuzyjnego peptydu może wywodzić się unikatowych cząsteczek autoindukcyjnych systemu *quorum sensing*, jak wiadomo niezbędnych dla skoordynowanego zachowania się całej populacji drobnoustrojów. Przykładem niech będzie połączenie peptydu RIP, inhibitora QS *S. aureus*, z pochodną dermaseptyny – peptydu biobójczego wyizolowanego ze skóry żaby. Należy wyrazić nadzieję, iż technologia „STAMP", mając aktualnie do dyspozycji doskonałe techniki syntezy peptydów oraz zaawansowane narzędzia biologii molekularnej, posiada odpowiedni warsztat, aby dostarczyć w bliskiej przyszłości wielu cząsteczek o potencjalnej wartości terapeutycznej [3, 13, 19].

3. Fitozwiązki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym

Uzasadnieniem dla obserwowanego wzrostu zainteresowania roślinami, jako naturalnymi źródłami czynników przeciwdrobnoustrojowych, jest niewątpliwie pogłębiający się kryzys epidemiologiczny związany z narastającą antybiotykoopornością. Dodatkową motywacją są niepowodzenia w tradycyjnym zwalczaniu biofilmów, z racji ich zdecydowanie większej oporności. Celem badań prowadzonych na całym świecie, jest nie tylko naukowe potwierdzenie wartości znanych roślin leczniczych, ale także identyfikacja nowych źródeł bardziej skutecznych leków. Rośliny, podobnie jak organizmy zwierzęce, wykształciły w drodze ewolucji mechanizmy pozwalające na unikanie efektów ataku mikroorganizmów, oparte na wytwarzaniu substancji ochronnych, zazwyczaj drugorzędnych metabolitów. Produkty te obejmują dwa rodzaje substancji syntetyzowanych w celu zapobiegania (prohibitiny) lub naprawy zaistniałych uszkodzeń tkanek (fitoaleksyny). Związki o silnej aktywności bakteriostatycznej i bakteriobójczej zaliczane są w większości do fitoaleksyn. W obrębie tej grupy wydają się najważniejsze olejki eteryczne, pod względem chemicznym – złożone mieszaniny substancji, z których przynajmniej jedna wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe. Największa grupa związków chemicznych wchodzących w ich skład to terpeny, syntetyzowane z jednostek izoprenowych Należące do tej klasy monoterpeny i seskwiterpeny są najczęstszymi jednostkami chemicznymi identyfikowanymi w olejkach eterycznych, obok diterpenów i innych związków aromatycznych (fenole, garbniki, flawonoidy) lub alifatycznych (alkohole, estry, aldehydy, ketony, tlenki, alkeny, węglowodory) [10, 17].

Pomimo, iż dokładny mechanizm działania wielu składników olejków eterycznych nie został dotąd poznany, rozważa się istnienie kilku możliwych szlaków ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Uważa się, iż mechanizmy te mogą być częściowo zależne od hydrofobowości wielu fitozwiązków, która umożliwia im łatwe wbudowywanie i uszkadzanie dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej, zwiększając jej przepuszczalność i prowadząc do lizy komórki. Innym mechanizmem potencjalnego działania olejków roślinnych może być upośledzenie działania systemów enzymatycznych bakterii. Składniki olejków eterycznych mogą także oddziaływać na białka zlokalizowane w dwuwarstwie lipidowej, w wyniku akumulacji lipofilnych cyklicznych węglowodorów i zakłócania interakcji pomiędzy białkami i lipidami, bądź też wiązania z odpowiednimi fragmentami hydrofobowymi samych białek. Na szczególną uwagę, w kontekście rosnącej oporności drobnoustrojów wobec dostępnych leków, zasługuje opisywana ostatnio możliwość wykorzystania produktów roślinnych jako czynników modulujących oporność drobnoustrojów (RMAs – ang. resistance modyfying agents). Jak się bowiem okazuje, wiele związków roślinnych posiada zdolność oddziaływania na niektóre struktury (białko PBP2') i niektóre mechanizmy (pompy MDR) odpowiedzialne za dany fenotyp antybiotykooporności [10, 17, 20, 25, 26, 31].

Śledzenie doniesień literaturowych na temat badań nad aktywnością substancji pochodzących z roślin potwierdziło, iż wiele aspektów aktywności fitozwiązków wobec bakterii nie zostało do tej pory wystarczająco zbadanych; dotyczy to m.in. ich działania przeciwbiofilmowego. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż potwierdzenie w pracy własnej aktywności przeciwgronkowcowej produktów pozyskanych z *Salvia sclarea* wobec hodowli planktonicznych i zachęcające efekty ich działania zwalczającego biofilmy gronkowców, spotkały się z akceptacją wyników badań i ich publikacji w czasopismach fitomedycznych [23, 38]. Prezentowana w tych i innych pracach zdolność blokowania przez związki pochodzące z roślin różnych mechanizmów odpowiedzialnych za oporność bakterii wobec antybiotyków, stanowi ważne odkrycie na drodze do rozwoju nowych strategii terapii, zwłaszcza wobec szczepów wielolekoopornych. W literaturze z ostatnich lat znaleźć można kilka prac dotyczących

badań nad przeciwbiofilmową aktywnością fitozwiązków, co zapowiada intensyfikację badań w tym zakresie. Niezwykle interesujący aspekt tych badań, to kierowanie uwagi na możliwość hamowania procesów metabolicznych bakterii i grzybów regulowanych w systemach *quorum sensing*, przez produkty roślinne [1, 20, 30, 36].

4. Konkurencja makroorganizmu i drobnoustrojów o mikroelementy

Żelazo jest pierwiastkiem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie, jednocześnie niezbędnym dla funkcjonowania żywych komórek. Występując zarówno w formie wolnej, jak i związanej z białkami, odgrywa zasadniczą rolę jako kofaktor enzymów transportujących elektrony w metabolizmie tlenowym oraz białek transportujących tlen w ustroju. Wiadomo, że kontrolowany precyzyjnie niski poziom dostępngo dla mikroorganizmów wolnego żelaza (ok. 10^{-18}M), zabezpiecza gospodarza przed ich namnażaniem. Środowisko ubogie w atomy żelaza jest rezultatem aktywności siderofilin, tj. głównych białek chelatujących żelazo – transferyny i laktoferyny, których nasycenie żelazem wynosi około 30–40%. Zaistnienie procesu infekcyjnego jest sygnałem dla makroorganizmu do wzrostu np. poziomu laktoferyny i tym samym dodatkowego obniżania poziomu dostępnego żelaza (hypoferemia infekcyjna). Znaczącą rolę regulatorową w tym procesie pełni hepcydyna. Jest to białko składające się z 25 aminokwasów, które jest produkowane głównie w wątrobie, chociaż ostatnio stwierdzono również jego syntezę w neutrofilach i makrofagach. Wprawdzie struktura cząsteczki hepcydyny przypomina budowę wielu peptydów/białek przeciwbakteryjnych, ale wykazuje ona *in vitro* tylko niewielką bezpośrednią aktywność bójczą. Nie znaczy to, że udział hepcydyny w patogenezie zakażeń można pominąć; obecne badania koncentrują się bowiem na wyjaśnieniu hepcydyno-zależnych mechanizmów regulujących ogólny metabolizm żelaza w procesach fizjologicznych i patologicznych. Wykazano jej niezaprzeczalną rolę w regulacji wchłaniania żelaza w jelicie cienkim i uwalniania z makrofagów, poprzez wiązanie i inaktywację ferroportyny, która jest jedynym znanym transporterem usuwającym żelazo z komórek [2, 7, 41].

Zjawisko bakteriostazy wywoływanej przez czynniki sekwestrujące jony żelaza jest zwykle krótkotrwałe i wynika z wykształcenia przez drobnoustroje skutecznych sposobów jego odzyskiwania, z udziałem różnych mechanizmów. Należą do nich produkowane przez bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie siderofory wychwytujące żelazo związane z cząsteczkami siderofilin a także systemy transportowe, do których zaliczane są transportery ABC oraz występujące na powierzchni komórki bakteryjnej receptory dla np. laktoferyny i transferyny. Badania prowadzone od wielu lat dostarczyły przekonywujących dowodów potwierdzających wcześniejsze obserwacje, iż jony żelaza są jednym z najważniejszych czynników wpływających na rozmnażanie bakterii, ekspresję określonych czynników wirulencji i ich zdolność m.in. do tworzenia biofilmu. Uzasadnia to zainteresowanie możliwością zamierzonej interwencji w pozyskiwanie żelaza przez drobnoustroje, które od kilku lat ma wyraz w licznych publikowanych pracach doświadczalnych. Wykazano w nich, że np. zastosowanie chelatora jonów metali dwuwartościowych – EDTA powoduje „uwrażliwienie" bakterii na działanie wielu produktów biobójczych. Co ciekawe, stwierdzono, że zastosowanie tego chelatora w połączeniu np. z minocykliną skutkuje niszczeniem biofilmu tworzonego na powierzchni cewników przez bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz grzyby drożdżopodobne. W badaniach nad możliwością zastosowania EDTA w odniesieniu do biofilmu *P. aeruginosa* stwierdzono niszczenie, głównie wewnętrznych warstw grzybkowatych dojrzałego biofilmu i jego łatwiejszą dyspersję. Skuteczność działania EDTA, związku o stosunkowo szerokim zakresie własności chelatujących, nie tylko w stosunku do jonów żelaza, ale i magnezu oraz wapnia, sugeruje wspólny udział tych jonów w tworzeniu biofilmu i stabilizacji jego struktury. Jednakże, tylko chelatowanie jonów żelaza i wapnia, w mniejszym stopniu magnezu i baru, okazało się być skutecznym sposobem niszczenia biofilmu. Wydaje się, że te dwa pierwsze jony mają największe znaczenie stabilizujące usieciowanie egzoplisacharydów matriks biofilmu. Natomiast, nie do końca wyjaśniona jest kwestia bezpośredniego wpływu biopierwiastków, zastosowanych samodzielnie lub łącznie z innymi preparatami bójczymi, na stopień żywotności bakterii. Jak się sugeruje w nielicznych opracowaniach, negatywny wpływ deficytu magnezu na stabilność LPS i jego uwalnianie ze ściany komórkowej skutkujące wzrostem przepuszczalności osłon, może być jedną z przyczyn „uwrażliwienia" bakterii na działanie np. antybiotyków. Obiecujące obniżenie pewnych parametrów wirulencji drobnoustrojów w wyniku ograniczenia dostępu do jonów żelaza przez stosowanie chelatorów żelaza uzyskane w warunkach laboratoryjnych, niestety nie zawsze przekłada się na sukces w warunkach *in vivo* [4].

Umiarkowany optymizm w kwestii możliwości niszczenia lub choćby naruszania struktury biofilmu przez ograniczanie dostępu żelaza, był przyczyną zainteresowania innymi sposobami ingerencji w żywotne procesy metaboliczne drobnoustrojów. W tym celu użyto galu, pierwiastka bardzo podobnego do żelaza. Pomysł użycia galu jako substytutu żelaza został opra-

cowany przez grupę prowadzoną przez S i n g h i wsp. [22, 33]. Okazało się, że gal zachowuje się jak „koń trojański" dla bakterii poszukującej żelaza. Chociaż tak podobny do żelaza, że wiele układów biologicznych nie odróżnia $Ga3^+$ od $Fe3^+$, gal nie podlega redukcji do stanu $Ga2^+$. Obserwacja ta ma ogromne potencjalne znaczenie terapeutyczne, bo jak wiadomo, głównie jony $Fe2^+$ spełniają właściwą wewnątrzkomórkową rolę biologiczną. Tak więc, na „nieszczęście bakterii", pozyskany przez komórki gal, kiedy już jest w jej wnętrzu, nie może pełnić funkcji żelaza, co wpływa negatywnie na wiele funkcji drobnoustroju. Wykazano, że gal zapobiega nie tylko tworzeniu biofilmu, ale bezpośrednio przyczynia się do zabijania drobnoustrojów. Istotne jest także spostrzeżenie, iż działanie galu zwiększa się, gdy w środowisku jest mało jonów żelaza, a taka właśnie sytuacja ma miejsce podczas infekcji w ludzkim organizmie (wydajne sekwestrowanie jonów żelaza przez układy hepcydyna/siderofiliny/ferrytyna oraz zmiany w ekspresji komórkowych receptorów dla białek wiążących żelazo). Jak na razie, terapia galem została dopuszczona do zastosowania klinicznego przez FDA w Stanach Zjednoczonych, w przypadkach niektórych nowotworów i stanach hiperkalcemi. W odniesieniu do użycia galu w stanach infekcyjnych, zastosowanie to na razie pozostaje w sferze badań laboratoryjnych, ale ich wyniki są bardzo obiecujące. Większość z nich dotyczy ograniczenia wzrostu, zahamowania rozwoju biofilmu i zabijania *P. aeruginosa in vitro* [22].

5. Podsumowanie

Powyższy przegląd danych z piśmiennictwa służy uzasadnieniu faktu podejmowania szeroko zakrojonych badań nad alternatywnymi sposobami zwalczania infekcji, szczególnie tych, u których podstaw patogenezy leży utworzenie biofilmu. Niewątpliwie, podniesienie skuteczności antybiotykoterapii i wypracowania standardów alternatywnego leczenia przez zastosowanie kombinacji różnych czynników biobójczych jest wyzwaniem nowoczesnej mikrobiologii i medycyny. Osobną kwestią, którą należy zasygnalizować, a która w niniejszym opracowaniu nie zostanie rozwinięta, to możliwość terapeutycznego wykorzystania naturalnie produkowanych cząsteczek zakłócających komunikację między komórkami drobnoustrojów – *quorum sensing* (QS). Poza pierwszymi opisanymi produktami tego typu, pochodzącymi z plechy australijskiej czerwonej algi *Delisea pulchra*, aktualnie znanych jest co najmniej kilkanaście naturalnych produktów wykazujących aktywność w stosunku do bakteryjnych cząsteczek QS. Wiele innych roślin wyższych, grzybów i bakterii jest bogatym źródłem, zarówno analogów autoinduktorów bakterii o działaniu inhibicyjnym w stosunku do QS, jak i analogów o działaniu stymulującym. Kilka lat temu produkcję inhibitorów bakteryjnych sygnałów międzykomórkowych stwierdzono również w komórkach nabłonkowych błon śluzowych i fagocytach człowieka. Bakterie, glony, rośliny wyższe oraz komórki zwierzęce mogą także zaburzać procesy komunikacji QS przez obniżanie stężenia autoinduktorów w danej mikroniszy, np. przy pomocy enzymów degradujących ich strukturę i niekiedy przez wykorzystywanie cząsteczek autoinduktorów jako źródła węgla, azotu i energii [1, 28, 30].

Śledząc treść wątków dyskusji rozwijających się podczas dorocznego sympozjum nt. biofilmów, opublikowanych w postaci „Meeting Review, Biofilms 2007: Broadened Horizons and New Emphases" [28], można zauważyć zbieżność najbardziej aktualnych tematów rozważań nad metodami zwalczania biofilmów, z tematami/problemami przywołanymi w niniejszym opracowaniu.

Piśmiennictwo

1. Adonizio A.L., Downum K., Bennett B.C., Mathee K.: Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J. Ethnopharmacol*. **105**, 427–435 (2006)
2. Andrew N.C.: Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J. Clin. Invest.* **113**, 1251–1253 (2004)
3. Balaban N., Gov Y., Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., Orlando F., D'Amato G., Saba V., Scalise G., Bernes S., Mor A.: A chimeric peptide composed of a dermaseptin derivative and an RNA III-inhibiting peptide prevents grft-associated infections by antibiotic-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**, 2544–2550 (2004)
4. Banin E., Brady K.M, Greenberg E.P.: Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol*. **72**, 2064–2069 (2006)
5. Boyd A., Chakrabarty A.M.: Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2355–2359 (1994)
6. Barequet I.S., Ben Simon G.J., Safrin M., Ohman D.E., Kessler E.: *Pseudomonas aeruginosa* LasA protease in treatment of experimental staphylococcal keratitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1681–1687 (2004)
7. Brazil M.: Squatters' rights need ironing out. *Nature Rev. Drug Discov*. **1**, 488–491 (2002)
8. de Carvalho C.C.C.R.: Biofilms: Recent developments on an old battle. *Recent Patents in Biotechnol.* **1**, 49–57 (2007)
9. Costerton J.W., Veeh R., Shirtliff M., Pasmore M., Post Ch., Erlich G.: The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest*. **112**, 1466–147 (2003)
10. Cowan M.M.: Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 564–582 (1999)
11. Davey M.E., Caiazza N.C., O'Toole G.A.: Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol*. **185**, 1027–1036 (2003)
12. Devine D.A., Hancock R.E. W.: Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 703–714 (2002)

13. Eckert R., He J., Yarbrough D.K, Qi F.,. Anderson M.H., Shi W.: Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided „Smart" antimicrobial peptide *Antimicrob. Agents Chemother*. **50**, 3651–3657 (2006)
14. Espinosa-Urgel M.: Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J. Bacteriol*. **185**, 699–700 (2003)
15. Farnaud S., Evans R.W.: Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* **40**, 395–405 (2003)
16. Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P.: Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**, 34–40 (2005)
17. Gibbons S.: Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochem. Rev.* **4**, 63–78 (2005)
18. Hall-Stoodley L., Stoodley P.: Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13**, 7–10 (2005)
19. He J., Eckert R., Pharm T., Simanian M.D., Hu C., Yarbrough D.K., Qi F., Anderson M.H., Shi W.: Novel synthetic antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1351–1358 (2007)
20. Huber B., Eberl L., Feucht W., Polster J.: Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum sensing. *Z. Naturforsch.* **58***C*, 879–884 (2003)
21. Johansen C., Falholt P., Gram L.: Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol*. **63**, 3724–3728 (1997)
22. Kaneko Y, Thoendel M., Olakanmi O., Britigan B.E., Singh P.K. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J. Clin. Invest*. **117**, 877–888 (2007)
23. Kuźma Ł., M. Różalski, E. Walencka, B. Różalska, H. Wysokińska.: Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.; salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant staphylococci. *Phytomedicine,* **14**, 31–35 (2007)
24. Lewis K.: Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 999–1007 (2001)
25. Lewis K., Ausubel F.M.: Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature Biotech*. **12**, 1504–1507 (2006)
26. Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L.: Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* **31**, 247–256 (2000)
27. Ofek I., Hasty D.L., Sharon N.: Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* **38**, 181–191 (2003)
28. Palmer R.J. Jr., Stoodley P.: Biofilms 2007: Broadened horizons and new emphases. *J. Bacteriol*. **189**, 7948–7960 (2007)
29. Pamp S.J., Tolker-Nielsen T.: Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. **189**, 2531–2539 (2007)
30. Rasmussen T.B., Givskov M.: Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol*. **296**, 149–161 (2006)
31. Rios J.L., Recio M.C.: Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 80–84 (2005)
32. Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.: Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother*. **57**, 609–618 (2006)
33. Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P., Welsh M.J.: A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, **417**, 552–555 (2002)
34. Shintani H.: Modification of medical device surface to attain anti-infection. *Trends Biomater. Artif. Organs*, **18**, 1–8 (2004)
35. Singh P.K.: Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *Biometals*, **17**, 267–270 (2004)
36. Vattem D.A , Mihalik K., Crixell S.H., McLean R.J.C.: Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*. **78**, 302–310 (2007)
37. Walencka E., Sadowska B., Różalska S., Hryniewicz W., Różalska B.: *Staphylococcus aureus* biofilm as a target for single or repeat doses of oxacillin, vancomycin, linezolid and/or lysostaphin. *Folia Microbiol*. **51**, 381–386 (2006)
38. Walencka E., Różalska S., Wysokińska H., Różalski M., Kuźma Ł., Różalska B.: Salvipisone and aethiopinone from *Salvia sclarea* hairy roots modulate staphylococcal antibiotic resistance and express anti-biofilm activity. *Planta Med*. **73**, 545–551 (2007)
39. Walencka E., Więckowska-Szakiel M., Różalska B., Sadowska B., Różalska B.: A surface-active agent from *Saccharomyces cerevisiae* influences staphylococcal adhesion and biofilm development. *Z. Naturforsch.* **62***C*, 433–438 (2007)
40. Walencka E., Różalska S., Sadowska B., Różalska B.: The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol*. **53**, 61–66 (2008)
41. Weinberg E.D.: Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Med. Hypotheses*, **63**, 863–865 (2004)
42. Xavier J.B., Picioreanu C., Rani S.A., van Loosdrecht M.C.M., Stewart P.S.: Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study. *Microbiology*, **151**, 3817–3832 (2005)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 379–385
http://www.pm.microbiology.pl

60 LAT SZCZEPIEŃ BCG. OSIĄGNIĘCIA, PRZEGRANE I NADZIEJE – NOWE SZCZEPIONKI PRZECIWGRUŹLICZE W PROGRAMACH KLINICZNYCH

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Wiesława Rudnicka*, Karolina Rudnicka

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, tel. (42) 635 44 72
* Autor korespondencyjny: e-mail: rudw@biol.uni.lodz.pl

1. Gruźlica. 2. Odporność w zakażeniach *Mycobacterium tuberculosis.* 3. Nowe szczepionki przeciwgruźlicze. 4. Podsumowanie

60 years of BCG vaccination. Attainments, failures and hopes – new vaccines in clinical trials

Abstract: Tuberculosis represents a serious problem for public health worldwide. The attenuated *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) are widely used as tuberculosis vaccine for newborns. BCG prevents severe forms of childhood tuberculosis only and is unable to prevent pulmonary disease in adolescents and adults. Thus, a novel vaccine against tuberculosis is urgently needed. During the last years, great progress has been made in immunology, genetics and animal models of *M. tuberculosis* infections. Accordingly, several new vaccine candidates have been developed, many of which have entered clinical trials.

1. Tuberculosis. 2. Immunity to *Mycobacterium tuberculosis.* 3. New tuberculosis vaccines. 4. Summary

Słowa kluczowe: gruźlica, szczepionki rekombinowane i jednostkowe
Key words: tuberculosis, recombinant and subunit vaccines

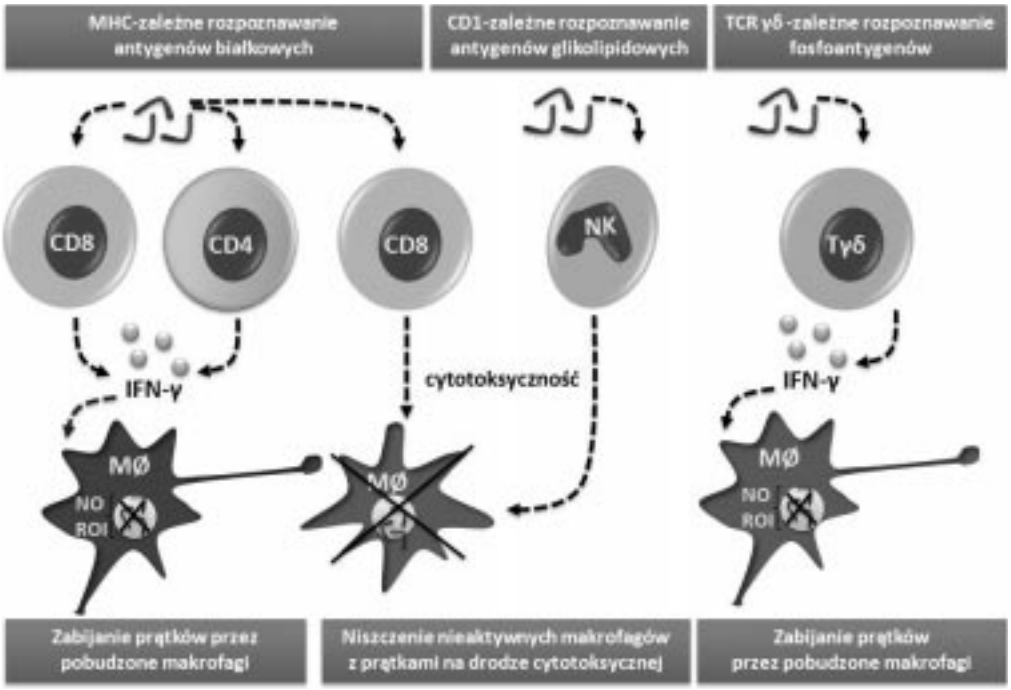
1. Gruźlica

Na początku 21-ego wieku, znakomita większość ludzi na słowo gruźlica reaguje pewną obawą. Nawet młodzi ludzie, którzy wiedzą niewiele o zmieniających wizerunek Świata wydarzeniach sprzed dwudziestu lat, na słowo gruźlica pomyślą o geniuszach w dziedzinie muzyki, literatury, malarstwa, których twórczość przerwała ta choroba. Czy uzasadnione są nadal obawy przed gruźlicą? Niestety, na pytanie to musimy odpowiedzieć twierdząco, jakkolwiek nie możemy nie dostrzegać tego, co w walce z gruźlicą udało się osiągnąć. Do przeszłości należy czas, gdy w 19-tym wieku, 25% zgonów, najczęściej młodych ludzi, było spowodowanych gruźlicą. Rozpoczęte, w latach 50-tych XX wieku przyczynowe leczenie gruźlicy i stosowanie na szeroką skalę szczepionki BCG (Bacille Calmette Guérin) pozwoliło na systematyczne zmniejszanie zapadalności i umieralności z powodu gruźlicy. Jednak późne lata 80-te to zahamowanie spadku zapadalności na gruźlicę, a w Afryce Subsaharyjskiej dramatyczny wzrost częstości zachorowań na tę chorobę. Pewien wzrost zachorowalności na gruźlicę odnotowano również w krajach wysoko rozwiniętych. Był to alarm, który spowodował sprzymierzenie się międzynarodowych organizacji rządowych wielu państw i koncernów przemysłowych z organizacjami, które od dawna walczyły z gruźlicą. Opracowano międzynarodowy program DOTS (The International Recommended Strategy for TB Control) obejmujący akty prawne i pomoc krajom o najwyższym współczynniku zapadalności na gruźlicę, standardową diagnostykę bakteriologiczną, standardy leczenia i monitoringu epidemiologicznego. Stan obecny to około 2 biliony ludzi zakażonych *Mycobacterium tuberculosis*. Liczba chorych na gruźlicę w roku 2006 – 14,6 miliona, najwięcej (83%) w Afryce, Południowej Azji i Zachodnim Pacyfiku [5]. Przybliżona liczba nowych zachorowań na gruźlicę w 2006 r. wyniosła 9,2 miliona, w tym 1,7 miliona osób zakażonych HIV. W tym samym roku, z powodu gruźlicy umarło 1,7 miliona ludzi, w tym 0,2 miliona zakażonych HIV. Szybko narastający problem stanowi gruźlica oporna na podstawowe leki przeciwprątkowe (MDR – multi drug resistant); w 2006 r liczbę przypadków gruźlicy MDR oceniono na około 0,5 miliona [3]. Obecnie izoluje się już od chorych szczepy XDR *M. tuberculosis*, oporne na izoniazyd, rifampicynę i dodatkowy/e leki przeciwgruźlicze. Ogólnoświatowy program walki z gruźlicą zakładał diagnozowanie 70% przypadków gruźlicy wykrywanej w badaniu bakterioskopowym i wyleczenie 85% takich przypadków do roku 2005, co spowodowało znaczny postęp w wykrywaniu choroby. Program ten zakłada również 50% zmniejszenie częstości gruźlicy do roku 2015, co pozwoliłoby wrócić do danych notowanych w latach 80-tych XX wieku. W roku 2050, gruźlica ma przestać być chorobą społeczną, z notowaniem mniej niż 1 przypadek aktywnej choroby/milion ludzi. Dla porównania, ogólnoświatowy wskaźnik oszacowany dla roku 2006 to 139 przypadków gruźlicy/100 000 ludzi [5]. W związku z takimi założeniami formułowane są następujące cele szczegółowe:

1. Skrócenie czasu leczenia gruźlicy; obecnie, leczenie gruźlicy z zastosowaniem polecanych schematów trwa 6–9 miesięcy.
2. Zredukowanie częstości powtórnych zachorowań na gruźlicę.
3. Zmniejszenie efektów ubocznych leków przeciwgruźliczych, uciążliwych dla pacjentów.
4. Opracowanie schematów jednoczesnego leczenia gruźlicy i AIDS.
5. Opracowanie schematów pozwalających leczyć gruźlicę MDR i XDR.
6. Produkcja nowych leków przeciwgruźliczych; ostatni wprowadzony do terapii gruźlicy lek to rifampicyna (1963 rok). Obecnie, duże koncerny farmaceutyczne podjęły produkcję nowych leków (głównie z grupy chinolonów), spośród których niektóre są już w II – III fazie badań przedklinicznych.
7. Opracowanie „biomarkerów" pozwalających szybko i tanio diagnozować gruźlicę i śledzić efekty leczenia.
8. Opracowanie nowych szczepionek przeciwgruźliczych, bardziej efektywnych niż szczepionka BCG.
9. Dalsze zwiększenie nakładów na światowe programy walki z gruźlicą: obecnie nakłady takie są 100-krotnie większe niż w latach 80-tych i 10-krotnie większe niż w latach 90-tych XX wieku.

2. Odporność w zakażeniach *M. tuberculosis*

Częstość choroby zakaźnej zależy głównie od trzech czynników: a) liczby osobników zakażonych (2 miliardy ludzi zakażonych *M. tuberculosis*) b) zdolności transmisyjnych patogenu (nadzwyczajna oporność prątków gruźlicy na czynniki inaktywujące inne drobnoustroje zwiększa szansę zakażania na drodze inhalacyjnej) c) liczby osobników podatnych na zakażenie i chorobotwórcze działanie patogenu (pomimo ogromnego postępu nadal nie potrafimy w jednoznaczny sposób odpowiedzieć na pytanie, na czym polega odporność na gruźlicę, i jak ją mierzyć). Bardzo skuteczną bronią przeciwko prątkom gruźlicy są wrodzone mechanizmy odporności (innate immunity) (Rys. 1). Są one w istotnym stopniu odpowiedzialne za to, że 90–95% ludzi zakażonych *M. tuberculosis* nigdy nie choruje na gruźlicę. Przyjmując jednak, że obecnie 2 miliardy ludzi jest zakażonych takimi bakteriami, możemy wyliczyć, że wcześniej lub później, zachoruje na gruźlicę 100–200 milionów spośród nich. Zrozumienie mechanizmów odporności, które zapewniają trwałe, utrzymujące się przez całe życie, wygaszenie pierwotnych ognisk gruźliczych u 90–95% osób zakażonych prątkami gruźlicy pozostaje słabo zrozumiałe. Biorąc pod uwagę przynależność *M. tuberculosis* do



Rys. 1. Udział limfocytów T w niszczeniu prątków gruźlicy rozwijających się w pęcherzykach fagocytarnych makrofagów.

Limfocyty efektorowe, nabytej odporności komórkowej, pomocnicze CD4(+) i cytotoksyczne CD8(+), rozpoznają antygeny białkowe prątków na zakażonych makrofagach, wydzielają IFN-γ, który aktywuje makrofagi, zwiększa ich aktywność prątkobójczą, między innymi przez nasilenie powstawania toksycznych pochodnych tlenku azotu oraz reaktywnych form tlenu (ROI – rective oxygen intermediate). Limfocyty T CD8(+) rozpoznające białka prątków oraz komórki NK (natural kliller) stanowiące mechanizm wrodzonej odporności, rozpoznające glikolipidy bakterii, niszczą słabo aktywne makrofagi, stanowiące niszę życiową prątków gruźlicy, w bezpośredniej reakcji cytotoksycznej. Uwalniane prątki mogą być pochłonięte i zniszczone przez bardziej aktywne makrofagi. Limfocyty z receptorami dla antygenu γ/δ rozpoznają fosfoantygeny mykobakterii, uwalniają IFN-γ zwiększający aktywność bójczą makrofagów.

grupy względnie wewnątrzkomórkowych patogenów bakteryjnych, namnażających się w pęcherzykach fagocytarnych makrofagów, można by sądzić, że zakażone *M. tuberculosis* osoby, które nigdy nie zachorują na gruźlicę, posiadają makrofagi naturalnie bardziej skuteczne w zwalczaniu prątków gruźlicy niż osoby zapadające na tę chorobę. Pogląd taki częściowo wspiera obserwowana w pewnych populacjach, zwiększona częstość występowania u chorych na gruźlicę, alleli polimorficznych genów: a) regulujących funkcje makrofagów np. *slc11a1* (*nramp-1* – natural resistance-associated macrophage protein-1), b) kodujących receptory makrofagowe rozpoznające wzorce molekularne patogenów (PAMP – pathogen associated molecular patern), takie jak TLR2 (Toll-like receptor 2), c) wariantów genowych *mbl*-2 determinujących niski lub wysoki poziom MBL (mannose binding lectin), istotnej w procesie fagocytozy. Jednak obserwacje takie, poczynione w odniesieniu do populacji o bardzo wysokiej i wysokiej częstości zapadalności na gruźlicę, nie znalazły potwierdzenia w badaniach obejmujących mieszkańców krajów o średnim współczynniku zachorowalności na tę chorobę np. Polski [4]. To sugeruje brak prostego przełożenia silnej aktywności prątkobójczej makrofagów na odporność na gruźlicę. Z drugiej strony nie sposób zaprzeczyć, że aktywność makrofagów ma kluczowe znaczenie w odporności na gruźlicę [12]. Można wyrazić nadzieję, że lepsze poznanie molekularnych procesów zachodzących w zakażonych *M. tuberculosis* makrofagach, doprowadzających do zniszczenia prątków lub odwrotnie ułatwiających im wewnątrzkomórkowy rozwój, pozwoli lepiej zrozumieć istotę wrodzonej odporności przeciwgruźliczej i opracować sposoby jej potęgowania przez użycie odpowiednich immunomodulatorów oraz produkować nowe leki przerywające szlaki metaboliczne niezbędne dla rozwoju mykobakterii w fagosomach makrofagów (patrz praca Marka F o l a w tym zeszycie).

Prątki gruźlicy są patogenami „oszczędzającymi" swoją niszę życiową, jaką stanowi zakażony nimi organizm człowieka. Tylko u niewielkiego procentu osób zakażonych *M. tuberculosis*, zazwyczaj z defektami odporności komórkowej, dochodzi do przejścia gruźlicy pierwotnej bezpośrednio w aktywną chorobę. U znakomitej większości ludzi zakażonych prątkami gruźlicy, następuje rozwój swoistej nabytej odporności komórkowej, „zamknięcia" prątków wewnątrz ziarniniaków (granuloma) i utrwalenia się zakażenia latentnego [12]. Takie zakażenie u większości ludzi utrzymuje się przez całe życie, ale cały czas grozi upłynnieniem ziarniniaków i rozwojem choroby, która jest doświadczeniem 5–10% osób zakażonych *M. tuberculo*sis. To przekonuje o tym, że naturalnie powstająca odporność na gruźlicę nie stanowi wystarczającego zabezpieczenia przed chorobą. Rozwiązania tego problemu, z sukcesem podjęli się badacze francuscy, C a l m e t t e i G u é r i n, którzy na początku lat 20-tych XX wieku, opracowali szczepionkę BCG. Szczepionkę tą stanowią żywe prątki *M. bovis*, które w wyniku długotrwałego pasażowania na podłożach (około 230 pasaży) utraciły właściwości chorobotwórcze, uległy trwałej, nieodwracalnej atenuacji. Prątki te zachowały jednak częściową zdolność do przeżywania w organizmie, na tyle długo, aby wywołać rozwój swoistej odporności komórkowej. Masowe szczepienia BCG rozpoczęto na początku lat 50-tych ubiegłego stulecia. Jak się ocenia, szczepionką tą zaszczepiono około 3 miliardy ludzi, w ponad 180-ciu krajach. Skuteczność szczepionki oceniana jest różnie, w zależności od terenu badań, od 80% w krajach Europy zachodniej do 0 w Indiach, w których była i jest bardzo wysoka ekspozycja na prątki *M. tuberculosis* (ponad 1,8 miliona zachorowań na gruźlicę w 2006 roku) [5] oraz mykobakterie środowiskowe, mogące krzyżowo reagować z prątkami gruźlicy [10]. Ogólnie twierdzi się, że szczepienia BCG zapobiegają gruźlicy uogólnionej (prosówce) i centralnego układu nerwowego u dzieci. Aktywność protekcyjna szczepionki BCG u dorosłych nie przekracza 50%.

3. Nowe szczepionki przeciwgruźlicze

Fakt, iż masowe użycie szczepionki BCG nie zlikwidowało problemu gruźlicy jako choroby społecznej, pojawienie się nowych problemów, jakimi są koinfekcja *M. tuberculosis* – wirus HIV oraz gruźlica MDR i XDR, narzucają konieczność opracowania nowej/nowych szczepionek przeciwgruźliczych, bardziej skutecznych niż szczepionka BCG. Opracowanie takich szczepionek podjęto w wielu renomowanych ośrodkach naukowych i koncernach biotechnologicznych. Rozpatrywana jest produkcja szczepionek nowej generacji, rekombinowanych, jednostkowych i DNA.

W dalszej części artykułu dyskusji poddam cztery szczepionki przeciwgruźlicze, które na podstawie wstępnych badań dopuszczone zostały do zastosowania u ludzi, w badaniach przedklinicznych (faza II i III). Wszystkie te szczepionki wykorzystują, albo na etapie produkcji, albo na etapie schematu szczepień, szczepionkę BCG, która stosowana na szeroką skalę, okazała się bezpieczną, możliwą do wstrzykiwania noworodkom tuż po urodzeniu, zawierającą natywne antygeny mykobakterii z grupy *Mycobacterium tuberculosis* Complex, indukującą odporność komórkową obejmującą aktywację limfocytów pomocniczych CD4(+) oraz limfocytów cytotoksycznych CD8(+) (Rys.1), a także względnie tanią. Pełne bezpieczeństwo szczepionki BCG jest kwestionowane tylko w odniesieniu do osób zakażonych wirusem HIV, u których może ona powodować poważniejsze, patologiczne efekty uboczne,

a ponadto, przynajmniej teoretycznie, pobudzając limfocyty T może sprzyjać namnażaniu się wirusa.

Nowo produkowane szczepionki przeciwgruźlicze powinny umożliwić:

1. doszczepianie ludzi dorosłych, u których osłabieniu uległa odporność komórkowa wzbudzona szczepionką BCG podaną tuż po urodzeniu (szczepionki typu „booster"),
2. zwiększenie bezpieczeństwa szczepionki, tak aby mogła być ona stosowana u osób zakażonych wirusem HIV,
3. zastosowanie szczepionki w terapii gruźlicy MDR i XDR.

Rozwój genomiki i proteomiki w powiązaniu z udoskonaleniem metod immunologii komórkowej, dostarczył nowej wiedzy o antygenach prątków gruźlicy i ich immunogenności. Jednym z głównych immunogenów *M. tuberculosis* jest złożony antygen sekrecyjny Ag85. McShane i wsp. [9] zastosowali podjednostkę Ag85A tego antygenu do otrzymania rekombinowanej szczepionki żywej wykorzystującej wysoko ekspresyjny zmodyfikowany wirus Vaccinia Ankara MVA (Modified Vaccinia Ankara). Przygotowana szczepionka MVA85A opracowana została w celu wzmacniania odporności na gruźlicę osób szczepionych atenuowanymi prątkami BCG w dzieciństwie. Jednym z rozpatrywanych powodów niedostatecznych właściwości protekcyjnych szczepionki BCG jest, postępujący wraz z wiekiem, zanik swoistej pamięci immunologicznej. Szczepienia BCG zapobiegają gruźlicy u dzieci, a efekt protekcyjny jest znacznie słabiej zaznaczony u dorosłych. W związku z takim tłumaczeniem, interesujący jest zaobserwowany przez nas znamiennie wyższy odsetek ujemnych testów tuberkulinowych u starszych niż młodszych pacjentów z aktywną gruźlicą. McShane i wsp. [9] dokonali wstępnej oceny szczepionki MVA85A u myszy, świnek morskich i naczelnych. Część zwierząt była szczepiona tylko szczepionką BCG (priming), druga część była szczepiona BCG, a następnie doszczepiana (booster) szczepionką rekombinowaną MVA85. Trzecią grupę stanowiły zwierzęta nieszczepione. Efekt protekcyjny szczepień oceniano po zakażeniu zwierząt *M. tuberculosis* drogą aerozolową. Stwierdzono, że zwierzęta doszczepiane szczepionką MVA85 wykazywały wyższy stopień protekcji niż zwierzęta szczepione tylko prątkami BCG. Wyniki tych badań uprawniły do podjęcia prób u ludzi. Szczepionkę MVA85 podano zdrowym ochotnikom, którzy nie byli szczepieni BCG, z wykluczonym zakażeniem latentnym *M. tuberculosis*. Zaobserwowano nasilenie antygenowo swoistej reaktywności limfocytów T. Szczepionka MVA85 okazała się również bezpieczna u osób z latentnym zakażeniem *M. tuberculosis,* oraz u mieszkańców Gambii i Południowej Afryki, krajów uznawanych za endemiczne w odniesieniu do gruźlicy. Efekty szczepień MVA85 sprawdzano na podstawie aktywności limfocytów T, obserwowanej w hodowlach komórkowych. Przechodząc do oceny efektywności tej i innych szczepionek przeciwgruźliczych trzeba zaznaczyć, że nie jest to zadanie łatwe. Interakcja mykobakterii z mechanizmami obronnymi atakowanego gospodarza jest niezwykle złożona (Rys. 1), obejmuje współdziałanie różnorodnych komórek układu odpornościowego, limfocytów T, makrofagów, komórek dendrytycznych i innych, receptorów, cytokin, chemokin [8, 12]. Niektóre z tych reakcji są korzystne dla zakażonej osoby, inne przeciwnie, są odpowiedzialne za zmiany patologiczne w gruźlicy. Czy, a jeśli tak to na ile, przyjmowane obecnie standardowe metody oceny parametrów immunologicznych pozwalają przewidywać skuteczność poszczepiennej odporności na chorobotwórcze działanie prątków gruźlicy? Pytanie to pozostaje właściwie otwarte. Rozwijana przez lata i potwierdzana w badaniach laboratoryjnych i klinicznych rola IFN-γ w odporności na gruźlicę (Rys. 1) sprawia, że standardową metodą oceny skuteczności nowo konstruowanych szczepionek przeciwgruźliczych jest hodowla jednojądrzastych leukocytów krwi pobudzanych antygenami mykobakterii, w której ocenia się proliferację i sekrecję IFN-γ przez limfocyty pomocnicze CD4(+) typu Th1, jako główne komórki produkujące tę cytokinę w odpowiedzi na swoisty antygen. Przyjmując taki standard oceny, szczepionka MVA85, podana osobom uprzednio szczepionym BCG, spowodowała nasilenie odpowiedzi limfocytów T na zawarty w szczepionce antygen 85A *M. tuberculosis*. W reakcji na ten antygen proliferowały swoiste limfocyty CD4(+) Th1. Nastąpiło pobudzenie limfocytów pamięci immunologicznej o fenotypie CD45RO(+), co jest istotnie znaczące w przypadku szczepionki przeznaczonej do „doszczepiania" (booster). Ponadto, u osób szczepionych BCG i doszczepianych szczepionką MVA85 zanotowano aktywację limfocytów o fenotypie CD57, czynnych w cytotoksyczności niezależnej od cząsteczek Głównego Układu Zgodności Tkankowej MHC (Major Histocompatibility Complex) oraz wzmocnienie aktywności limfocytów T swoistych w stosunku do antygenów *M. tuberculosis*, Ag85A oraz ESAT-6 (early secretory antigenic target).

Antygeny ESAT-6 oraz TB-10.4 kodowane są przez geny regionu RD1 *M. tuberculosis*, które zostały utracone podczas atenuacji *M. bovis*, i których brak w szczepach BCG. Brak tych antygenów w obecnie stosowanej szczepionce przeciwgruźliczej może tłumaczyć jej słabszą od oczekiwanej skuteczność protekcyjną. Agger i wsp. [1] otrzymali szczepionkę jednostkową, która ich zdaniem może być wprowadzana wraz z szczepionką BCG małym dzieciom (Tandem administration), stosowana u małych dzieci, krót-

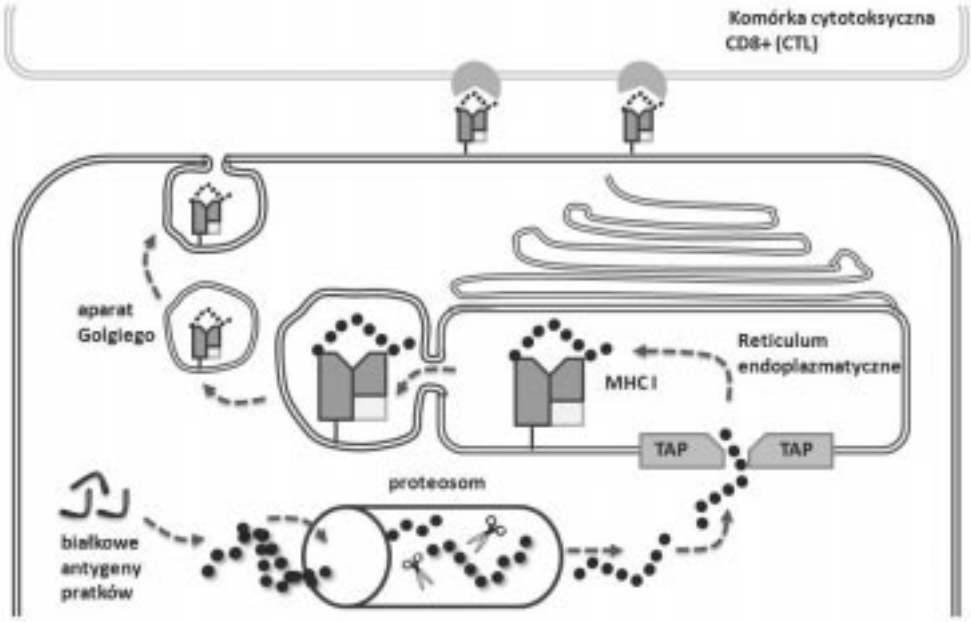
ko po wprowadzeniu szczepionki BCG (Early boost) oraz u osób dorosłych szczepionych BCG w dzieciństwie, u których odporność poszczepienna ulega osłabieniu (Late boost). Przygotowano dwie szczepionki rekombinowane zawierające:

ESAT-6 + Ag85B + adiuwant IC31,

TB10.4 + Ag85B + adiuwant IC31.

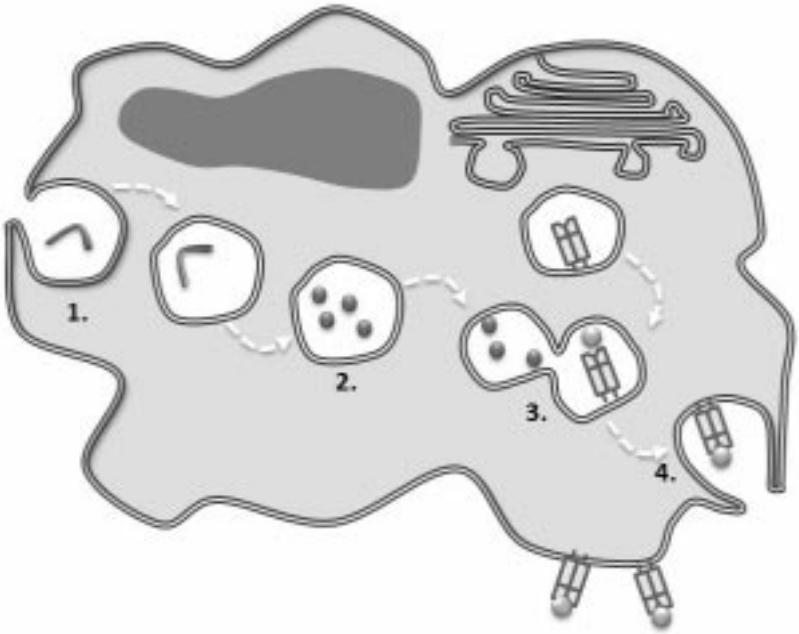
Adiuwant nowej generacji IC31 to oligodeoxynukleotyd zawierający deoxy-inozynę i deoxy-cytozynę oraz antybakteryjny peptyd KLKL(5)KLK. Faza I badań przeprowadzona u zwierząt wykazała, że przygotowane szczepionki pobudzały swoiste limfocyty T pomocnicze CD4(+) Th1, co manifestowało się produkcją IFN-γ i IL-2, jako czynnika wzrostowego wszystkich limfocytów T. W fazie II badań szczepionkę podano 36 osobom zdrowym, które nigdy nie chorowały na gruźlicę, z ujemnym odczynem tuberkulinowym, bez kontaktu z chorymi na gruźlicę, z wykluczonym zakażeniem latentnym *M. tuberculosis*, stwierdzając u zaszczepionych osób, brak reakcji poszczepiennych poza przejściowymi, niewielkimi zmianami w miejscu wstrzyknięcia. W testach komórkowych obserwowano odpowiedź głównie na antygen Ag85. Omawiane szczepionki jednostkowe były również dobrze tolerowane przez osoby, które wcześniej otrzymywały szczepionkę BCG. Obecnie trwają próby otrzymania i oceny białka fuzyjnego Ag85B/ESAT-6/TB10.4.

H o r o w i t z i wsp. [6] pracę nad przygotowaniem nowej szczepionki przeciwgruźliczej rozpoczęli od otrzymania rekombinanta BCG produkującego sekrecyjne białko Ag85B *M. tuberculosis* o masie 30 kDa (rBCG30). W fazie I badań, świnki morskie szczepiono BCG lub rBCG30, a następnie po 10 tygodniach zakażano je aerozolem zawierającym *M. tuberculosis*. Dziesięć tygodni później, oceniono liczbę prątków *M. tuberculosis* w płucach zakażonych zwierząt. Świnki morskie szczepione rBCG30 eliminowały prątki gruźlicy efektywniej i przeżywały dłużej niż zwierzęta szczepione BCG. Rekombinowane prątki rBCG30 były silniejszym induktorem nadwrażliwości późnej (delayed type hypersensitivity – DTH) na białko r30 niż prątki BCG. W fazie II badań, szczepionkę rBCG30 podano ludziom, którzy ją dobrze tolerowali. Ponadto, szczepionka rBCG30 w porównaniu do szczepionki BCG, silniej pobudzała proliferację swoistych limfocytów pomocniczych CD4(+) i cytotoksycznych CD8(+), oraz pobudzała silniejszą produkcję IFN-γ. Aby wzmocnić uodporniającą aktywność szczepionki autorzy otrzymali rekombinanta rBCG30 z ekspresją ludzkiego IFN-γ (rBCG30/hIFN-γ). Świnki morskie uodporniane takim rekombinantem, po zakażeniu *M. tuberculosis*, jeszcze skuteczniej eliminowały prątki gruźlicy niż zwierzęta szczepione rekombinantem rBCG30. Aby zwiększyć bezpieczeństwo szczepionki rBCG30, pozwalające na użycie jej u osób z osłabioną odpornością komórkową np. zakażonych HIV, otrzymano mutanta [rBCG(mtb)30] z defektem w syntezie mykobaktyny, niezbędnej dla pozyskiwania żelaza przez



Rys. 2. Przetwarzanie antygenów prątków rozpoznawanych przez cytotoksyczne limfocyty T CD8(+), w proteosomach komórek prezentujących antygen (APC – antigen presenting cell).

Przenikające do cytosolu APC antygeny prątków są cięte do peptydów w proteosomach, przenoszone przez białka transportujące TAP (transporter associated with antigen processing) do retikulum śródplazmatycznego, łączone z cząsteczkami głównego układu zgodności tkankowej MHC (major histocompatibility complex) klasy I i eksponowane na powierzchni. Przetworzone peptydy połączone z MHC klasy I są rozpoznawane przez receptory dla antygenu na limfocytach cytotoksycznych (CTL – cytotoxic T lymphocyte).



Ryc. 3. Przetwarzanie antygenów prątków rozpoznawanych przez pomocnicze limfocyty T CD4(+), w endosomach komórek prezentujących antygen (APC – antigen presenting cell).

1. Pochłaniane przez makrofagi lub komórki dendrytyczne prątki gruźlicy, przeżywają i namnażają się w pęcherzykach fagocytarnych (fagosomach). 2. Z chwilą zakwaszenia fagosomu, optimum aktywności uzyskują enzymy lizosomalne, które rozcinają antygeny prątków do peptydów. 3. Syntetyzowane cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej (MHC) klasy II łączą się z peptydami mykobakterii. 4. Powstające immunopeptydy (peptyd – MHC klasy II) są eksponowane na powierzchni makrofaga/komórki dendrytycznej i mogą być rozpoznawane przez receptory antygenów pomocniczych limfocytów T CD4(+).

prątki. Taki mutant ma ograniczone możliwości replikacji w organizmie. Użyty do uodpornienia świnek morskich, przed ich zakażeniem *M. tuberculosis*, wzmagał proces eliminacji prątków gruźlicy i rozwój DTH na białko r30, w większym stopniu niż prątki BCG.

Liczni badacze kluczowe znaczenie w odporności na gruźlicę przypisują swoistym limfocytom cytotoksycznym T o fenotypie CD8(+). Wiadomo, że słabo aktywne makrofagi nie są w stanie zabić pochłoniętych prątków gruźlicy i stanowią niszę życiową tych bakterii. Limfocyty cytotoksyczne rozpoznają antygeny prątków na takich makrofagach, niszczą te komórki w bezpośredniej reakcji cytotoksycznej (Rys. 1). Uwalniające się z takich makrofagów prątki gruźlicy mogą być pochłonięte przez bardziej aktywne makrofagi, które je zniszczą. Przyjmując naczelną rolę limfocytów T cytotoksycznych w odporności na gruźlicę trzeba było wyznaczyć odbiegającą od schematów strategię przygotowania szczepionki przeciwgruźliczej. Limfocyty T cytotoksyczne CD8(+) rozpoznają swoiste antygeny, przetwarzane do peptydów w proteasomach, w cytosolu komórki, i połączone z cząsteczkami MHC klasy I (Rys. 2). Jednak prątki gruźlicy rozwijają się w pęcherzykach fagocytarnych makrofagów. Zatem ich antygeny podlegają rozcinaniu do peptydów w endosomach i są łączone z cząsteczkami MHC klasy II (Rys. 3). W takiej postaci rozpoznają je limfocyty T pomocnicze CD4(+), w tym limfocyty o fenotypie Th1, które pobudzone wydzielają IFN-γ, który aktywuje makrofagi zwiększając ich aktywność prątkobójczą (Rys. 1). K a u f m a n n i wsp. [7] i R e e c e i K a u f m a n n [11] chcąc umożliwić przetwarzanie antygenów szczepionkowych prątków na drodze cytosolowej, otrzymali rekombinowane prątki BCG z ekspresją listeriolizyny, głównego czynnika chorobotwórczości bakterii *Listeria monocytogenes*. Listeriolizyna O, tworząca pory hemolizyna, kodowana przez gen *hly*A, umożliwia pałeczkom *L. monocytogenes* ucieczkę z pęcherzyków fagocytarnych do cytoplazmy, w której mogą się namnażać nie narażone na działanie enzymów lizosomalnych. Aby zapewnić optimum działania listeriolizynie O, w środowisku kwaśnym, w rekombinancie BCG-*Hly* zinaktywowano gen ureazy. Przygotowana rekombinowana szczepionka rBCG:Δ*ure*C-*Hly* wykazała znacznie silniejsze właściwości protekcyjne u myszy zakażanych *M. tuberculosis* niż szczepionka BCG. W roku 2005 została ona dopuszczona do użycia w badaniach przedklinicznych u ludzi. Szczepionka rBCG:Δ*ure*C-*Hly* skonstruowana została w sposób umożliwiający pobudzenie swoistych limfocytów cytotoksycznych CD8(+) na drodze tzw. alternatywnej z wykorzystaniem tzw. krzyżowego przetwarzania antygenów egzogennych w cytosolu komórek prezentujących antygen (komórek dendrytycznych i makrofagów) i łączenia ich z cząsteczkami MHC klasy I. Krzyżowe przetwarzanie (cross-proces-

sing) antygenów prątków *M. tuberculosis*, odpowiedzialne za cross-priming w zakażonym organizmie, może odbywać się na kilku drogach [2]. Pęcherzyki fagocytarne (fagosomy) makrofagów zawierające prątki gruźlicy nie są „szczelne". Pewne antygeny bakterii mogą przemieszczać się bezpośrednio z fagosomu do cytosolu i być przetwarzane w proteosomach. Zakażone prątkami gruźlicy makrofagi mogą tworzyć egzosomy zawierające antygeny prątków, które mogą być pochłaniane przez sąsiednie komórki dendrytyczne, przetwarzane i łączone z cząsteczkami MHC klasy I. Wreszcie, zakażone prątkami gruźlicy makrofagi mogą ulegać apoptozie, z powstawaniem ciałek apoptycznych zawierających antygeny bakterii. W tej formie antygeny prątków gruźlicy mogą być pochłaniane przez komórki dendrytyczne i prezentowane swoistym limfocytom cytotoksycznym na cząsteczkach MHC klasy I.

4. Podsumowanie

Wypadkowa reakcja odpornościowa na prątki gruźlicy, która decyduje o odporności na chorobotwórcze działanie *M. tuberculosis*, obejmuje wiele ogniw, które mogą decydować o indywidualnej odporności na gruźlicę lub przeciwnie o podatności na tą chorobę. Stwarza to szerokie możliwości proponowania różnorodnych modeli uodporniania ludzi i zwierząt na gruźlicę, ale z drugiej strony sugeruje, że przygotowanie szczepionki przeciwgruźliczej lepszej niż BCG, która pozwoliłaby pokonać w pełnym stopniu doskonałą adaptację prątków *M. tuberculosis* do rozwoju w żywych komórkach gospodarza, nie jest zadaniem łatwym. W obecnej chwili istnieje również pilna potrzeba określenia sposobów oceny skuteczności protekcyjnej konstruowanych nowych szczepionek przeciwgruźliczych na podstawie mierzalnych parametrów reaktywności komórek układu odpornościowego.

Piśmiennictwo

1. Agger E.M., Andersen P. i wsp. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine*, **24**, 5452–5460 (2006) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
2. Boom W.H. New TB vaccines: is there a requirement for $CD8^+$ T cells? *J. Clin. Invest*. **117**, 2092–2094 (2007)
3. Dorman S.E., Chaisson R.E.: From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nature Med*. **13**, 295–298 (2007)
4. Druszczyńska M., Starpagiel D., Kwiatkowska S., Kowalewicz-Kulbat M., Różalska B., Chmiela M., Rudnicka W.: Tuberculosis bacilli still posing a threat. Polymorphism of genes regulating anti-mycobacterial properties of macrophages. *Pol. J. Microbiol*. **55**, 7–12 (2006)
5. Global Tuberculosis Control I WHO Report 2008 (http:// www.who.int./tb/publications/ global.report/20)
6. Horwitz M.A., Harth G., Tullius M.V., Dillon B.J., Maslesa-Gali S.: New more potent and safer recombinant BCG vaccines against tuberculosis. Tuberculosis: From Lab Research to Field Trials. Stefan H.E. Kaufmann, Issar Smith, Carl F. Nathan. Keyston Symposia on Molecular and Cellular Biology. March 20–25, 2007, Vancouver, Canada, p. 60
7. Kaufmann S.H.E., Parida S.K.: Changing funding patterns in tuberculosis. *Nature Med*. **13**, 299–303 (2007)
8. Kowalewicz-Kulbat M., Pestel J., Biet F., Locht C., Tonnel A.B., Druszczyńska M. Rudnicka W.: *Mycobacterium bovis* BCG mycobacteria. New application. *Pol. J. Microbiol.* **55**, 13–17 (2006)
9. McShane H., Pathan A. i wsp. Boosting BCG with MVA85A – Results from Clinical Trials. Tuberculosis: From Lab Research to Field Trials. S.H.E. Kaufmann, I. Smith, C.F. Nathan. Keyston Symposia on Molecular and cellular Biology. March 20–25, 2007, Vancouver, Canada, p. 61
10. Mittrücker H-W., Steinhoff U., Köhler A., Krause M., Lazar D., Mex P., Miekley D., Kaufmann S.H.E.: Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 1234–1239 (2007)
11. Reece S.T., Kaufmann S.H.: Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology. *Int. J. Med. Microbiol*. **298**, 143–150 (2008)
12. Rudnicka W.: Molekularne mechanizmy odporności na gruźlicę. *Post. Mikrobiol*. **43**, 107–127 (2004)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 387–392
http://www.pm.microbiology.pl

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS – JAK PRZETRWAĆ NA WROGIM TERENIE?

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Marek Fol

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź. tel. (42) 635 43 58, e-mail: marekfol@poczta.onet.pl

1. Wstęp. 2. Hamowanie fuzji fagosomalno-lizosomalnej. 3. System mtrA-mtrB i jego potencjalny wpływ na przeżywalność prątków w makrofagach. 4. Dysfunkcja mykobakteryjnych fagosomów w zakresie obniżania pH. 5. Zmiany w ekspresji cząsteczek MHC kl. II w obecności prąków gruźlicy. 6. Mykobakterie kontra indukowalna syntaza tlenku azotu (iNOS, NOS2). 7. Białko TACO a przeżywalność prątków w makrofagach. 8. Znaczenie lipidów błony komórkowej w strategii obronnej mykobakterii. 9. Podsumowanie

***Mycobacterium tuberculosis* – how to survive in a hostile environment?**

Abstract: *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for at least one and half million deaths per year. Estimates are that one third of the world's population is infected with thist bacterial pathogen. Macrophages are known to be the reservoir of infection by mycobacteria. Infected host develops a strong immune response, however it is believed that the immune response can control, but not eliminate, the infection, indicating that *M. tuberculosis* has possessed mechanisms to modulate or avoid defense action mounted by the host. The successful parasitization of macrophage by *M. tuberculosis* involves: inhibition of phagolysosome fusion as a consequence of the deficiency in the early-late endosome transfer or maturation, reduced acidification of mycobacterial phagosomes, prevention or reduction of iNOS colocalization with mycobacterial phagosomes and downregulation of MHC class II expression required for effective antigen presentation. The author has also included in the review the possible participation of 2CR bacterial signal transduction system mtrA-mtrB and mycobacterial membrane lipids tn the successful survival of *M. tuberculosis* within macrophages.

1. Introduction. 2. Inhibition of the fusion of mycobacteria-containing phagosomes with lysosomes. 3. mtrA-mtrB system and its potential influence on the survival of mycobacteria in macrophages. 4. Limited acidification of mycobacterial phagosomes. 5. Changes of MHC class II molecules in the presence of mycobacteria. 6. Mycobacteria versus inducible nitric oxide synthase (iNOS, NOS2). 7. TACO protein and survival of bacilli in macrophages. 8. Importance of membrane lipids in the defense strategy of mycobacteria. 9. Summary

Słowa kluczowe: prątki gruźlicy, fagosom, lipidy mykobakteryjne, 2CR, syntaza tlenku azotu
Key words: Tubercle bacilli, phagosome, mycobacterial lipids, 2CR, nitric oxide synthase

1. Wstęp

Gruźlica niezmiennie pozostaje jedną z najbardziej rozpowszechnionych bakteryjnych chorób zakaźnych, stając się co roku przyczyną śmierci co najmniej 1,5 miliona ludzi na całym świecie. Szacuje się, że ogółem niemal 1/3 populacji Ziemi jest w chwili obecnej zakażona prątkami gruźlicy, a ponad 1,5 miliona zgonów rocznie jest następstwem tej choroby [14]. Sprawia to, że pośród wszystkich chorób zakaźanych, gruźlica pod względem śmiertelności plasuje się na drugim miejscu, tuż za AIDS [12, 14, 28]. Chociaż obszarami szczególnie dotkniętymi gruźlicą są kraje rozwijające się Regionu Azji Południowo-Wshodniej oraz Afryki Subsaharyjskiej, to w przypadku krajów wysokouprzemysłowionych zauważa się wyhamowanie krzywej spadkowej zachorowań, co sprawia, iż w skali globu z niepokojem odnotowuje się tendencję wzrostową zachorowań na gruźlicę [14]. W Polsce problem gruźlicy pozostaje poważny. W 2001 r. szacowana liczba zachorowań na gruźlicę wynosiła 26 na 100.000 mieszkańców, a w 2004 – 23, co stanowi nadal wysoki odsetek na tle innych krajów Europy Zachodniej [46]. Ponadto notuje się szybki wzrost częstości izolacji szczepów MDR *M. tuberculosis* (multidrug resistant tuberculli) oraz izolowane są szczepy o zwiększonej transmisyjności. Uwzględnić należy bardzo wysoką zapadalność na gruźlicę w sąsiadujących z Polską krajach byłych Republik Radzieckich (70–100 przypadków gruźlicy na 100.000 mieszkańców) [46] oraz najczęstsze izolowanie od chorych z tych rejonów szczepów opornych na leki przeciwprątkowe (ponad 10% nowych przypadków w Estonii, Łotwie i części Rosji) [14].

Szacuje się, że u około 90% zainfekowanych osób zakażenie przebiega bez żadnych klinicznych objawów nawet przez całe życie, przybierając formę infekcji latentnej. Nie obserwuje się wówczas żadnych oznak infekcji i nie dochodzi również do transmisji drobnoustrojów od osoby zainfekowanej do pozostałych osób. Osłabienie bądź załamanie się mechanizmów obronnych układu immunologicznego stwarza warunki dla „reaktywacji" zakażenia u 5–10% zainfekowanych osób, co prowadzi do rozwoju tzw. gruźlicy wtórnej. Najczęściej zwiazane jest to z zakażeniem wirusem HIV, podeszłym wiekiem, niedożywieniem. Również stres i przepracowanie mogą być takimi bodźcami [12, 28, 31].

2. Hamowanie fuzji fagosomalno-lizosomalnej

W przypadku prątków gruźlicy pierwszoplanową rolę w skutecznym „zasiedleniu" gospodarza odgrywa ich zdolność do efektywnego wniknięcia do komórek monocytarno-makrofagowych, wewnątrz których przeżywają i namnażają się sprawiając, że stają się one komórkami rezerwuarowymi dla tych drobnoustrojów [7]. We wnikaniu komórek mykobakterii do wnętrza komórek fagocytarnych pośredniczą m.in.: receptory Fc, receptory dopełniacza czy receptory mannozowe [1, 7, 28, 34, 35, 43]. Wyraźnym przykładem zmian zachodzących w zainfekowanych przez prątki gruźlicy komórkach jednojądrzastych fagocytów jest brak formowania pęcherzyka fagolizosomalnego, powstającego w następstwie połączenia się fagosomu z lizosomem [10, 28, 29, 32]. Dzięki zastosowaniu mikroskopii elektronowej, już we wczesnych latach 70-tych zaoberwowano, że w lizosomach gromadzone są zabite prątki podczas gdy żywe znajdowały się w wakuolach odmiennych morfologicznie od lizosomów, które określono mianem fagosomów mykobakteryjnych. Późniejsze badania, opierające się o bardziej nowoczesne techniki, potwierdziły, że żywe komórki mykobakterii po sfagocytowaniu przez makrofaga umiejscawiane są w obrębie organelli zawierających markery wczesnych, a nie późnych struktur endosomalnych [7, 28]. Badania D e r e t i c i wsp. wykazały, iż na powierzchni fagosomów zawierających komórki *M. bovis* BCG dochodzi do akumulacji cząsteczek Rab5, związanych z wczesnymi endosomami, natomiast fagosomy te pozbawione są markera Rab7, charakterystycznego dla fagosomów późnych. Wybiórcze gromadzenie Rab5 i jednoczesne wykluczenie Rab7 z grupy markerów obecnych na powierzchni fagosomów z pochłoniętymi komórkami mykobakterii może charakteryzować cząsteczki Rab (należące do grupy niskocząsteczkowych GTP-az) jako „molekularne" przełączniki procesu fuzji fagosomów z odpowiednio: wczesnymi i późnymi endosomami [8, 20, 44].

3. System mtrA-mtrB i jego potencjalny wpływ na przeżywalność prątków w makrofagach

W wewnątrzmakrofagowym przeżywaniu prątków gruźlicy zwraca uwagę rola bakteryjnych dwukomponentowych regulatorowych systemów przekaźnikowych (2CR – two-component regulatory signal transduction system). Na system 2CR składają się pary białek sensorowych i regulatorowych [19, 26, 39]. System ten uczestniczy w odbieraniu sygnałów ze środowiska zewnętrznego, a następnie w przesyłaniu ich do komórki bakteryjnej co skutkuje podjęciem określonych reakcji z jej strony. Genom *M. tuberculosis* posiada 11 zidentyfikowanych par genów kodujących systemy 2CR [2], pośród których jedynie system mtrA-mtrB jest całkowicie niezbędny dla wzrostu tych bakterii [45]. Wykazano, iż nadekspresja genu mtrA skutkuje zmniejszeniem przeżywalności takiego mutanta w makrofagach linii komórkowej THP-1 jak i w makrofagach pochodzących z monocytów krwii obwodowej. Podobnego zjawiska nie odnotowano w odniesieniu do szczepów z nadekspresją poszczególnych składowych innych systemów 2CR. Pozwala to sugerować, że nadekpresja genu *mtrA* jest odpowiedzialna za obserwowaną atenuację mutanta przejawiającą się osłabieniem wzrostu nie tylko w warunkach *in vitro*, ale również w płucach i śledzionie zainfekowanych myszy. Stosując mikroskopię konfokalną zaobserwowano, iż większość komórek *M. tuberculosis* z nadekspresją mtrA podlegała kolokalizacji z lizosomami posiadającymi na swej powierzchni cząsteczkę LAMP-1 (lysosome associated membrane protein one) uważaną za marker późnych (dojrzałych) fagosomów [13].

4. Dysfunkcja mykobakteryjnych fagosomów w zakresie obniżania pH

Brak fuzji fagosomalno-lizosomalnej to nie jedyny przejaw zmian zachodzących wewnątrz fagocytów jednojądrzastych po wniknięciu do nich mykobakterii, umożliwiających tym drobnoustrojom przeżycie. Mykobakteryjne fagosomy charakteryzują się również dysfunkcją w zakresie pH. Standardowo, sfagocytowany materiał poddawany jest działaniu coraz niższego pH w trakcie jak dochodzi do dojrzewania pęcherzyka fagosomalnego od fazy wczesnego do fazy późnego endosomu [22]. Za główny czynnik decydujący o zakwaszaniu środowiska fagosomu uważa sie enzymy z grupy ATP-az typu wakuolarnego (V-ATP-ases – vacuolar-type ATPases) [17]. W przypadku mykobakteryjnych fagosomów ma miejsce, dotąd nie w pełni poznany, mechanizm powodujący redukowanie poziomu zakwaszenia. Wśród możliwych przyczyn tego zjawiska wymienia się wybiórcze hamowanie fuzji pęcherzyka fagosomalnego z pęcherzykami pełniącymi rolę donorów częsteczek pomp protonowych z grupy ATP-az lub wskazuje się na możliwość bardzo szybkiego usuwania tych cząsteczek z powierzchni mykobakteryjnych fagosomów [40]. Istnieją jednakże prace wskazujące, iż wewnątrz fagosomów zawierających pochłonięte żywe *M. bovis* odnotowuje się pewien spadek poziomu zakwaszenia względem cytozolu, chociaż nie taki jak w przypadku fagosomów z zabitymi drobnoustrojami. Może to sugerować, iż cząsteczki V-ATP-az obecne są na powierzchni takich fagosomów tylko przejściowo lub owo ograniczone zakwaszenie następuje wskutek fuzji z alternatywnymi pęcherzykami o kwaśnym środowisku, pozbawionymi ATP-az [17].

5. Zmiany w ekspresji cząsteczek MHC kl. II w obecności prątków gruźlicy

Efektywna reakcja immunologiczna na zakażenia bakteryjne wymaga udziału różnych typów komórek układu immunologicznego. W przebiegu infekcji prątkami pierwszoplanową role odgrywają nie tylko makrofagi, ale również współpracujące z nimi limfocyty $CD4^+$ będące producentami szeregu cytokin, m.in. IFN-γ i TNF-α [42]. Limfocyty te rozpoznają zainfekowane przez mykobakterie komórki fagocytarne (makrofagi i komórki dendrytyczne) poprzez prezentowane przez nie, w kontekście czasteczek MHC kl. II, antygeny prątkowe. Wykazano, iż powstawanie kompleksu zawierającego cząsteczkę MHC kl. II i cząsteczkę antygenu prątkowego (podlegającą następnie prezentacji limfocytom) ma miejsce już w obrębie fagosomu, a nie później w trakcie „eksportu" antygenu bakteryjnego z fagosomu. Zauważono jednakże, iż w fagosomach zawierających uprzednio zabite komórki prątków (heat-killed) powstaje więcej kompleksów: MHC kl.II – antygen *M. tb* niż w przypadku fagosomów z żywymi prątkami [30]. W badaniach *in vitro* wykazano istnienie odwrotnej zależności między inensywnością infekcji a poziomem prezentacji cząsteczek MHC kl.II [24]. Zaobserwowano, iż w przypadku makrofagów szpikowych pochodzenia mysiego aktywowanych przez IFN-γ, zarówno żywe jak i zabite komórki *M. tuberculosis* mogą hamować prezentację antygenów prątkowych poprzez cząsteczeki MHC kl. II. Jednocześnie ze spadkiem ekspresji powierzchniowych cząsteczek MHC dochodzi do spadku ekspresji mRNA dla MHC kl. II [10, 24]. Chociaż sama synteza cząsteczek MHC kl. II a następnie ich tranzyt do struktur Golgiego zachodzą w sposób właściwie niezakłócony w komórkach makrofagowych infekowanych *M. tuberculosis*, to nie obserwuje się kolokalizacji MHC a markerami powierzchniowymi późnych endosomów i lizosomów (zwłaszcza z markerem LAMP-1). Postuluje się istnienie wadliwego transportu i przetwarzania (processing) cząsteczek MHC w obrębie systemu endosomalno-lizosomalnego, co może odpowiadać za zmniejszenie ekspresjii tych cząsteczek na powierzchni komórek zinfekowanych prątkami gruźlicy [18].

6. Mykobakterie kontra indukowalna syntaza tlenku azotu (iNOS, NOS2)

Aktywowane makrofagi wytwarzają, obok aktywnych form tlenu (ROI, reactive oxygen intermediates), również aktywne formy azotu (RNI, reactive nitrogen intermediates), wykazujące działanie bójcze m.in. w stosunku do prątków mykobaterii [6, 33]. Enzymem generującym wytwarzanie RNI w komórkach układu odpornościowego jest iNOS, który doprowadza do przekształcenia cząsteczki L-argininy do L-cytruliny z wytworzeniem rodnika tlenku azotu $NO^{\bullet}$, będącego punktem wyjścia dla powstania kolejnych RNI: NO_2^-, NO_3^-, $ONOO^-$ [21]. W badaniach z udziałem *Mycobacterium fortuitum* i komórek linii makrofagowej J774 wykazano m.in., iż bakterie te wykazują zdolność do ograniczania produkcji tlenku azotu (NO) przez komórki makrofagowe aktywowane IFN-γ, a obecność IFN-γ nie wpływa na zintensyfikowanie częstości zachodzenia fuzji między zawierającymi prątki fagosomami i lizosomami [4]. Odnotowano, iż po wniknięciu prątkow gruźlicy do komórki makrofagowej i zamknięciu ich w pęcherzykach fagosomow nie dochodzi do rekrutacji aktywowanej IFN-γ syntazy NO i jej kolokalizacji w bezpośrednim sąsiedztwie błony fagosomalnej. Tym samym, powstający z dala od bakterii tlenek azotu jest mniej skuteczny, co m.in. przyczynia się do przeżywalności mykobakterii wewnątrz fagocytów i ułatwia tym drobnoustrojom pozostanie przez długi czas w fazie latentnej [23].

7. Białko TACO a przeżywalność prątków w makrofagach

Analizując białka makrofagowe związane z fagosomami mykobakteryjnymi zaobserwowano, że w odróżnieniu od fagosomów zawierających zabite (heat-killed) prątki, na powierzchni tych zawierających żywe bakterie zidentyfikowano obecność białka TACO (tryptophane aspartate-containing coat protein), zwanego również coroniną1 (coronin1). Na przykładzie makrofagów J774A.1 zaobserwowano, że w komórkach niezainfekowanych białko to wykazuje silną kolokalizację z tubuliną i pozostaje w części obwodowej komórki (cortical), nie łacząc się z powierzchnią organelli układu endosomalno-lizosomalnego. Natychmiast po infekcji żywymi prątkami białko to przemieszcza się w bezpośrednie sąsiedztwo fagosomów i w ciągu pierwszych dwóch godzin całkowicie zanika w części kortykalnej komórki makrofaga. Nasuwa to przypuszczenia, iż będąc silnie związane jedynie z fagosomami posiadającymi żywe mykobakterie, białko TACO najprawdopodobniej przyczynia się do hamowania procesu dojrzewania takich fagosomów i w dalszej kolejności ich fuzji z lizosomami [9, 10, 28], chociaż pojawiają się przesłanki pozwalające przypuszczać, iż białko TACO nie jest jedynym mogącym uczestniczyć w tym zjawisku [36].

8. Znaczenie lipidów błony komórkowej w strategii obronnej mykobakterii

W badaniach mechanizmów obronnych mykobakterii uwagę badaczy zwracają m.in. związki lipidowe ich błony komórkowej, które obok białek stanowią

podstawowy jej element. Jedną ze szczególnych właściwości mykobakterii jest ich wyjątkowo bogata w związki tłuszczowe ściana komórkowa, co rodzi przypuszczenia, iż związki te mogą uczestniczyć w patogenezie tych drobnoustrojów [28]. Mykobakterie należąc do wewnątrzkomórkowych patogenów, posiadają zdolność do przeżywania i namnażania się wewnątrz komórek fagocytarnych gospodarza, a ich charakterystyczna struktura osłon komórkowych czyni je wyjątkowymi w grupie bakterii Gram-dodatnich, do których są zaliczane. Komórka mykobakterii chroniona jest bowiem nie tylko przez błonę komórkową zbudowaną z podwójnej warstwy fosfolipidów i białek, ale również otoczona jest warstwą peptydoglikanu, związanego kowalencyjnie z arabinogalaktanem połączonym z kolei z kwasami mykolowymi. Ponadto w skład osłony prątków wchodzą związki cukrowe: lipooligosacharydy i lipoarabinomannan oraz glikolipidy powierzchniowe. Wszystko to sprawia, iż komórka prątka gruźlicy okryta tak skonstruowanym szkieletem ściany komórkowej może być z jednej strony skutecznie chroniona przed mechanizmami odpornościowymi, z drugiej zaś – może to wpływać na jej sukces w wewnątrzkomórkowym przeżywaniu czy partycypować w wirulencji [3, 5, 16]. Zaobserwowano, że wyjątkowo bogata w glikolipidy ściana komórkowa tych bakterii może brać udział w interakcjach prątków gruźlicy z cholesterolem obecnym w membranie zewnętrznej komórki fagocytarnej gopodarza, co z kolei może przekładać się na zdolność tych bakterii do wnikania do wnętrza fagocytów [15]. Wiadomo ponadto, iż niektóre bakterie zdolne są do zmiany ładunku powierzchniowego fosfolipidów z ujemnego na dodatni. Dzieje się tak w wyniku przyłączania cząsteczki L-lizyny do fosfatygyloglicerolu (PG) obecnego w błonie komórkowej. W efekcie dochodzi do powstania lizylofosfatydyloglicerolu (L-PG) obdarzonego ładunkiem dodatnim. Dzięki takiemu mechanizmowi powierzchnia komórki bakterii staje się mniej wrażliwa na atak białek CAMP gospodarza (cationic antimicrobial peptides), posiadających rownież ładunek dodatni. Obecność takiego mechanizmu opisano najpierw u *Staphylococcus aureus*, u którego gen *mprF* detrminował syntezę białka MprF (multiple peptide resistant factor) o aktywności lizylotransferazy, odpowiedzialnego za przyłączanie L-lizyny (której źródłem jest lizylo-tRNA) do PG i powstawanie L-PG. Mutant wykazujący delecję genu *mprF* był zdecydowanie bardziej efektywnie niszczony przez neutrofile będące producentami antybakteryjnych białek z grupy defensyn [25, 27, 37]. Chociaż istnieje duża grupa bakterii posiadająca białka podobne w strukturze i sekwencji do MprF (MprF-related) to tylko u nielicznych bakterii stwierdzono obecność L-PG, jak np. *Listeria monocytogenes*, czy *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* i *Pseudomonas aeruginosa* [27, 38, 41]. Ponadto nie wiadomo czy owe MprF-pokrewne białka rzeczywiście bezpośrednio uczestniczą u nich w powstawaniu L-PG. W przypadku *L. monocytogenes* zidentyfikowano ostatnio gen *lmo*1695 kodujący białko Lmo1695 o masie cząsteczkowej 98kDa, będące składową błony komórkowej. Białko to wykazuje wysoki stopień homologii do MprF z *S. aureus* jednakże zaangażowane jest nie tylko w syntezę lizylofosfatydyloglicerolu (L-PG), lecz również w lizynylację dwufosfatydyloglicerolu (DPG), który obok PG jest także powszechnie obecnym w błonie komórkowej bakterii. Mutant w zakresie delecji *lmo*1695 był szczególnie wrażliwy na działanie białek CAMPs, a jego wirulencja byla zdecydowania zredukowana, co wykazały doświadczenia na modelu zwierzęcym [41]. Na podstawie analizy bioinformatycznej wykazano, iż u *M. tuberculosis* (*M.tb*) gen *lysX* (tzw. fusion gene) koduje enzym lizylotransferazy (*mprF*) oraz lizylo-tRNA syntetazy (*lysU*). Chociaż większość lipidów prątków jest dobrze scharakteryzowana to nadal nie wiadomo czy *M.tb* lizynyluje jakikolwiek lipid mimo posiadania genu *lysX*. Przeprowadzone dotąd badania z udziałem szczepu *M.tb* z delecją genu *lysX* starają się udzielić odpowiedzi na to pytanie (prace przygotowywane do druku). Wykazano, iż szczep nieposiadający genu *lysX* ma osłabioną przeżywalność w makrofagach linii komórkowych i krwi obwodowej, a także w płucach i śledzionie infekowanych zwierząt. Wykazuje on ponadto zdecydowanie większą wrażliwość na działanie wybranych antybiotyków z grupy białek kationowych. Mutant ten zdecydowanie intensywniej stymulował makrofagi do wytwarzania TNF-α i IL-12. Nie można wykluczyć, iż obserwowane zjawiska wynikją przynajmniej po części ze zmienionego profilu lipidowego będącego konsekwencją usunięcia genu *lysX*. Profil ten, obok lipidów wspólnych ze szczepem kontrolnym, wykazuje obecność kilku innych lipidów charakterystycznych tylko dla mutanta oraz brak pewnych lipidów będących we wzorze lipidowym kontrolnym (prace przygotowywane do druku).

9. Podsumowanie

W przebiegu infekcji prątkami gruźlicy udział biorą zarówno mechanizmy odporności wrodzonej jak i nabytej sprawiając, iż odpowiedź immunologiczna ma charakter wielowymiarowy [11, 12, 29, 31]. Komórki *M. tuberculosis* wykształciły jednakże szereg mechanizmów chroniących je przed skutkami reakcji immunologicznych gospodarza lub modulujących te reakcje. Najistotniejsze zmiany zachodzące w obrębie makrofagów zainfekowanych prątkami gruźlicy obejmują: brak formowania fagolizosomów, zahamowanie procesu dojrzewania mykobakteryjnych pęcherzyków

endosomalnych (czego wyrazem jest chociażby brak markerów charakterystycznych dla tzw. późnych endosomów jak np. Rab7), brak efektywnego obniżania poziomu pH w fagosomach, spadek poziomu ekspresji cząsteczek MHC kl. II, zmniejszenie rekrutacji syntazy NO w bezpośrednie sąsiedztwo fagosomów. Pełniejsze poznanie tych zjawisk i procesów z wykorzystaniem nowych mutanów *M. tuberculosis* w obrębie systemów 2CR oraz w obrębie komponentów lipidowych ich osłon komórkowych przyczyni się do powstania pełniejszego obrazu strategii tych drobnoustrojów umożliwiającej im skuteczne przetrwanie w potencjalnie niesprzyjającym środowisku fagocytów i być może pozwoli na opracowanie w przyszłości skuteczniejszych preparatów szczepionkowych czy też leków przeciwgruźliczych.

Piśmiennictwo

1. Brown E.J.: Complement receptors and phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol*. **3**, 76–82 (1991)
2. Cole S.T., B.G. Barrell i wsp.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**, 537–544 (1998) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
3. Cox J.S., Chen B., McNeil M., Jacobs W.R. Jr.: Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature*, **402**, 79–83 (1999)
4. da Silva T.R., de Freitas J.R., Silva Q.C., Fiqueira C.P., Roxo E., Leão S.C., de Freitas L.A., Veras P.S.: Virulent *Mycobacterium fortuitum* restricts NO production by a gamma interferon-activated J774 cell line and phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun*. **70**, 5628–5634 (2002)
5. Daffe M., Draper P.: The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol*. **39**, 131–203 (1998)
6. Denis M.: Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell. Immunol*. **132**, 150–157 (1991)
7. Deretic V., Fratti R.A.: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol. Microbiol*. **31**, 1603–1609 (1999)
8. Deretic V., Via L.E., Fratti R.A., Deretic D.: Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, and intracellular trafficking. *Electrophoresis*, **18**, 2542–2547 (1997)
9. Ferrari G., Langen H., Naito M., Pieters J.: A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of *Mycobacteria*. *Cell*, **97**, 435–447 (1999)
10. Flynn J.L., Chan J.: Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr. Opin. Immunol*. **15**, 450–455 (2003)
11. Flynn J.L., Chan J.: Immunology of tuberculosis. *Ann. Rev. Immunol*. **19**, 93–129 (2001)
12. Flynn J.L.: Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis*, **84**, 93–101 (2004)
13. Fol M., Chauhan A., Nair N.K., Maloney E., Moomey M., Jagannath C., Madiraju M.V.V.S., Rajagopalan M.: Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator. *Mol. Microbiol*. **60**, 643–657 (2006)
14. Frieden T.R., Sterling T., Munsiff S.S., Watt C.J., Dye C.: Tuberculosis. *Lancet*, **362**, 887–899 (2003)
15. Gatfield J., Pieters J.: Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, **288**, 1647–1650 (2000)
16. Glickman M.S., Cox J.S., Jacobs W.R. Jr.: A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for coding, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell*. **5**, 717–727 (2000)
17. Hackam D.J., Rotstein O.D., Zhang W.J., Demaurex N., Woodside M., Tsai O., Grinstein S.: Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na^+/H^+ exchangers, $Na+/K^+$–ATPases, and vacuolar-type H^+–ATPases. *J. Biol. Chem*. **272**, 29810–29820 (1997)
18. Hmama Z., Gabathuler R., Jefferies W.A., de Jong G., Reiner N.E.: Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration class II heterodimers. *J. Immunol*. **161**, 4882–4893 (1998)
19. Hoch J.A.: Two component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol*. **3**, 165–170 (2000)
20. Kelley V., Schorey J.S.: Mycobacterium's arrest of phagosome maturation in macrophages reuires Rab5 activity and accessibility to iron. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3366–3377 (2003)
21. MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C.: Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol*. **15**, 323–350 (1997)
22. Mellman I., Fuchs R., Helenius A.: Acidification of endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem*. **55**, 663–700 (1986)
23. Miller B.H., Fratti R.A., Poschet J.F., Timmins G.S., Master S.S., Burgos M., Marletta M.A.: Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect. Immun*. **72**, 2872–2878 (2004)
24. Noss E.H., Harding C.V., Boom W.H.: *Mycobacterium tuberculosis* inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages. *Cell. Immunol*. **201**, 63–74 (2000)
25. Oku Y., Kurokawa K., Ichihashi N., Sekimizu K.: Characterization of the *Staphylococcus aureus* mprF gene, involved in lysinylation of phosphatidylglycerol. *Microbiology*, **150**, 45–51 (2004)
26. Parkinson J.S., Kofoid E.C.: Communication modules in bacterial signalling proteins. *Am. Rev. Genet*. **26**, 71–112 (1992)
27. Peschel A., J.A.G. van Strijp i wsp.: *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med*. **193**, 1067–1076 (2001) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
28. Pieters J.: Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect*. **3**, 249–255 (2001)
29. Raja A.: Immunology of tuberculosis. *Indian J. Med. Res*. **120**, 213–232 (2004)
30. Ramachandra L., Noss E., Boom W.H., Harding C.V.: Processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *J. Exp. Med*. **194**, 1421–1432 (2001)
31. Russel D.G.: *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **8**, 569–577 (2001)
32. Russell D.G.: Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. *Nat. Cell. Biol*. **5**, 776–778 (2003)
33. Sato K., Akaki T., Tomioka H.: Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN-γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α). *Clin. Exp. Immunol*. **112**, 63–68 (1998)

34. Schlesinger L.S.: Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **215**, 71–96 (1996)
35. Schorey J.S., Carroll M.C., Brown E.J.: A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*, **277**, 1091–1093
36. Schuller S., Neefjes J., Ottenhoff T., Thole J., Young D.: Coronin is involved in uptake of *Mycobacterium bovis* BCG in human macrophages but not in phagosome maintenance. *Cell. Microbiol*. **3**, 785–793 (2001)
37. Staubitz P., Neummann H., Schneider T., Wiedemann I., Peschel A.: Mpr-F mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol. Letters*, **231**, 67–71 (2004)
38. Staubitz P., Peschel A.: MprF-mediated lysinylation of phospholipids in *Bacillus subtilis* – protection against bacteriocins in terrestrial habitats? *Microbiology*, **148**, 3331–3332 (2002)
39. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N.: Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem*. **69**, 183–215 (2000)
40. Strugill-Koszycki S., Schlesinger P.H., Chakraborty P., Haddix P.L., Collins H.L., Fok A.K., Allen R.D., Gluck S.L., Heuser J., Russell D.G.: Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, **263**, 678–681 (1994)
41. Thedieck K., Hain T., Mohamed W., Tindall B.J., Nimitz M., Chakraborty T., Wehland J., Jänsch L.: The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol*. **62**, 1325–1339 (2006)
42. Tsukaguchu K., Balaji K.N., Boom W.H.: CD4+ alpha-beta T cell and gamma-delta T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*: similarities and differences in antigen recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J. Immunol*. **154**, 1786–1796 (1995)
43. Vergne I., Chua J., Singh S.B., Deretic V.: Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **20**, 367–394 (2004)
44. Via L.E., Deretic D., Ulmer R.J., Hibler N.S., Huber L.A., Deretic V.: Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J. Biol. Chem*. **272**, 13326–13331 (1997)
45. Zahrt T.C., Deretic V.: An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol*. **182**, 3832–3838 (2000)
46. World Health Organization, Atlas of Health in Europe, Regional Office for Europe, Denmark, Copenhagen, ISBN 9289013702

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 393–399
http://www.pm.microbiology.pl

STAPHYLOCOCCUS AUREUS JAKO WEWNĄTRZKOMÓRKOWY PATOGEN KOMÓREK UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Joanna Kozieł*, Agnieszka Maciąg-Gudowska, Jan Potempa

Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, tel. (12) 664 63 87
* Autor korespondencyjny: e-mail: kaniajoanna@gmail.com

1. *Staphylococcus aureus* – ogólna charakterystyka. 2. *S. aureus* jako patogen wewnątrzkomórkowy. 2.1. Nieprofesjonalne fagocyty. 2.2. Profesjonalne fagocyty. 3. Udział wewnątrzkomórkowego *S. aureus* w rozwoju infekcji. 4. Modulacja ekspresji genów gospodarza pod wpływem *S. aureus*. 5. Podsumowanie

Staphylococcus aureus *as an intracellular pathogen of immunological cells*

Abstract: Although *Staphylococcus aureus* is considered an extracellular pathogen, it is able to invade a variety of mammalian non-professional phagocytes, such as keratynocytes, fibroblasts or osteoblasts. Moreover, it has been demonstrated that this bacterium can survive engulfment by professional phagocytes, such as neutrophiles, monocytes or macrophages; each of which are regarded as essential to the innate host defense against invading microorganisms. Depending on the cell type *S. aureus* either stays within phagocytic or endosomal vacuoles, or promptly escapes from these membranous compartments and proliferates within the cytoplasm. *S. aureus* growth in the cytoplasm quickly leads to apoptosis. In some cases, however, this bacterium may delay the process of programmed host-cell death, with infected cells maintaining their viability and physiological functions. Survival of these infected host cells, especially those able to migrate, such as macrophages, may contribute to the rapid spreading of infection. In this article, we briefly describe some possible effects of the intracellular endurance of *S. aureus* within cells of the immune system, and the contribution of this process to the dissemination of infection. Indeed, the modulation of host-response gene expression programs upon *S. aureus* phagocytosis, and intracellular persistency of the live pathogen, may be considered an important mechanism of staphylococcal virulence. Analysis of *S. aureus*-specific responses elicited in macrophages may help to explain the means of bacterial intracellular survival, and thereof improve our understanding of immune system defenses against *S. aureus*. Ultimately, this may lead to insights into the mechanisms and pathways of pathogenesis during staphylococcal infections.

1. *Staphylococcus aureus* – main characteristics. 2. *S. aureus* as an intracellular pathogen. 2.1. Non-professional phagocytes. 2.2. Professional phagocytes. 3. Contribution of intracellular *S. aureus* to infection spreading. 4. Modulation of host's gene expression by *S. aureus*. 5. Summary

Słowa kluczowe: ekspresja genów, infekcja, profesjonalne fagocyty, *Staphylococcus aureus*, wewnątrzkomórkowe przeżycie
Key words: gene expression, infection, professional phagocytes, *Staphylococcus aureus*, intracellular survival

1. *Staphylococcus aureus* – ogólna charakterystyka

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest Gram-dodatnim ziarniakiem uważanym za jeden z najgroźniejszych patogenów organizmu człowieka, jako że jest czynnikiem etiologicznym rozlicznych infekcji. Obok schorzeń o łagodnym przebiegu, mających często charakter lokalny (np. infekcje skórne, zatrucia pokarmowe) drobnoustrój ten może być przyczyną zagrażających życiu infekcji systemowych, takich jak artretyzm czy posocznica. Swoją zjadliwość bakteria ta zawdzięcza szerokiemu spektrum czynników patogennych, do których zalicza się elementy strukturalne komórki, takie jak otoczki lub adhezyny powierzchniowe, a także szereg białek sekrecyjnych (egzotoksyny, enzymy zewnątrzkomórkowe). Najgroźniejszymi czynnikami wirulencji gronkowca złocistego są toksyny, które mogą działać lokalnie lub systemowo, indukując poważne stany chorobowe. Na szczególną uwagę zasługują: enterotoksyna wywołująca zatrucia pokarmowe, toksyna epidermolityczna odpowiedzialna za pęcherzycę noworodków, płonicę gronkowcową, martwicę i złuszczanie naskórka (SSSS – *staphylococcal scaled skin syndrome*), czy toksyna wstrząsu toksycznego powodująca zespół wstrząsu toksycznego (TSS – *toxic shock syndrom*) [1, 37, 43].

Gronkowiec złocisty jest niezwykle adaptatywnym patogenem, co zawdzięcza takim cechom, jak: zdolność szybkiego namnażania w miejscu infekcji, kolonizacja różnorodnych tkanek, inwazyjność oraz umiejętność przetrwania w ustroju gospodarza dzięki interferencji z jego mechanizmami obronnymi [1, 37].

2. *S. aureus* jako patogen wewnątrzkomórkowy

Przez szereg lat *S. aureus* był postrzegany jako typowo zewnątrzkomórkowy patogen, jednakże badania naukowe ostatnich kilkunastu lat niezbicie wskazują na adaptację tego ziarniaka do wewnątrzkomórkowej niszy ekologicznej. Obecnie uważa się, że podłoże wielu przewlekłych, nawracających się i trudnych do

leczenia infekcji gronkowcowych jest związane właśnie ze zdolnością gronkowca złocistego do przeżywania wewnątrz komórek gospodarza [11, 36].

2.1. Nieprofesjonalne fagocyty

Przeprowadzone w ostatnich latach badania *in vitro* wykazały, że gronkowiec złocisty może dokonywać inwazji wielu nieprofesjonalnych komórek fagocytujących, w tym: keratynocytów, fibroblastów, komórek śródbłonkowych, nabłonkowych, enterocytów i osteoblastów [6, 26, 28, 40, 45]. Pochłanianie bakterii jest możliwe dzięki tworzeniu mostków fibronektynowych pomiędzy integrynami $\alpha_5\beta_1$ gospodarza a gronkowcowymi białkami wiążącymi fibronektynę (FnBPs – *fibronectin binding proteins*) [15, 19, 53]. Proces ten prowadzi do aktywacji przekazu sygnału z udziałem tyrozynowych kinaz białkowych Src, co skutkuje rearanżacją cytoszkieletu komórki i umożliwia internalizację adherentych bakterii przez tzw. mechanizm zamka błyskawicznego (*zipper mechanism*) [18]. Pochłonięte bakterie rezydują w wakuolach endosomalnych, bądź trafiają do autofagosomów. Proces ten zależy zarówno od typu infekowanej komórki, jak również od szczepu *S. aureus* [50]. Udowodniono, że gronkowiec może uwalniać się do cytoplazmy i tym samym indukować śmierć komórki na drodze apoptozy [6, 40, 45]. Istnieją również dowody na to, że proces apoptozy komórek skolonizowanych przez gronkowca zostaje poprzedzony wewnątrzkomórkową proliferacją bakterii [31].

W świetle tych faktów wydaje się wielce prawdopodobne, że patogeneza takich chorób jak np. zapalenie wsierdzia (*endocarditis*), gruczołu sutkowego u bydła (*mastitis*), czy zapalenie szpiku kostnego (*osteomyelitis*) ma swoje podłoże m.in. w wewnątrzkomórkowej aktywności bakterii *S. aureus* odpowiednio w komórkach śródbłonka naczyń wieńcowych, epitelium gruczołu sutkowego oraz osteoklastów [36].

2.2. Profesjonalne fagocyty

Zjawisko inwazji komórek gospodarza przez gronkowca złocistego obserwuje się również w przypadku profesjonalnych komórek fagocytujących, w tym: neutrofili, monocytów i makrofagów, których rolą jest aktywne pochłanianie drobnoustrojów i ich zabijanie. Tylko nieliczne patogeny mają zdolność neutralizacji mechanizmów obronnych komórek układu immunologicznego. Drobnoustroje te stosują rozmaite strategie pozwalające na przeżycie i proliferację w profesjonalnych fagocytach. Niektóre bakterie modyfikują środowisko fagosomu i przekształcają je w dogodne miejsce do replikacji (*Legionella pneumophila*) [52], inne zaś stosują strategię ucieczki z fagosomu do cytoplazmy (*Shigella*) [20].

Pierwsze wzmianki dotyczące przeżywania gronkowca wewnątrz ssaczych, w tym również ludzkich leukocytów (monocytów i neutrofili), sięgają lat 50-tych [32, 39, 48]. W latach 80-tych pojawiło się kilka doniesień dokumentujących analogiczne zjawisko przeżywania *S. aureus* w makrofagach. Badania te w większości ograniczały się do krótkotrwałego (do 24 godzin) monitorowania proliferacji bakterii [5, 30], a jedynie C r a v e n i wsp. udokumentowali obecność *S. aureus* w makrofagach w 4 dniu od fagocytozy bakterii [12]. Najnowsze badania z wykorzystaniem ludzkiego modelu makrofagów różnicowanych *in vitro* z monocytów krwi obwodowej (hMdMs – *human monocyte-derived macrophages*) dowiodły, że pojedyncze komórki sfagocytowanego gronkowca mają zdolność do przetrwania wewnątrz fagocyta w metabolicznie aktywnej formie przez 4–6 dni bez naruszenia żywotności komórki gospodarza, po czym mogą się uwalniać i błyskawicznie namnażać w medium hodowlanym doprowadzając do lizy pozostałych komórek w hodowli [34].

Badania z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazały, że ludzkie makrofagi w hodowli *in vitro* bardzo wydajnie pochłaniają *S. aureus* poprzez utworzenie typowego, przestrzennego pseudopodium w postaci kubka (*phagocytic cup*) powstałego wskutek reorganizacji elementów cytoszkieletu i błony komórkowej. W procesie fagocytozy zaangażowane są m.in. receptory zmiatacze (*scavenger receptors*) klasy A i B (CD36), które przyłączają zopsonizowane białkami ludzkiej surowicy bakterie [54]. Początkowo gronkowce zostają ulokowane w „ciasnych", otoczonych błoną komórkową wakuolach, które w kolejnych dniach od fagocytozy powiększają swoje rozmiary i rozluźniają swoją strukturę prawdopodobnie wskutek aktywności zewnątrzwydzielniczej pochłoniętego gronkowca. W 4–5 dniu po infekcji obserwuje się częściową lub całkowitą degradację otaczającej wakuolę błony komórkowej, a w kolejnych dniach gronkowiec uwalnia się do środowiska zewnętrznego. Istotnym jest fakt, że w każdym dniu po infekcji dostrzegalne są komórki gronkowca w fazie podziału poprzecznego. Obserwacje te, poczynione na utrwalonych preparatach, potwierdzają wyniki doświadczeń wykonanych z wykorzystaniem techniki obrazowania konfokalnego wskazujących na przeżywanie *S. aureus* wewnątrz makrofagów [34]. Podobnych obserwacji dokonali G r e s h a m i wsp. badając mysie neutrofile wyizolowane z miejsca toczącej się infekcji gronkowcowej [21]. Na tej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, że gronkowiec złocisty w wakuolach fagocytarnych komórek żernych jest odporny na bakteriobójczy atak licznych czynników antybakteryjnych. Powyższe przykłady niezbicie udowadniają fakt przeżywania gronkowca wewnątrz profe-

sjonalnych fagocytów, ale nie tłumaczą mechanizmu zaangażowanego w ten proces. Najnowsze badania przeprowadzone na komórkach HeLa wskazują na wykorzystanie przez gronkowce szlaku autofagii, co umożliwia uniknięcie fuzji fagosomu z lizosomem [50].

Dalsze losy profesjonalnych fagocytów, będących nosicielem żywego gronkowca, są zróżnicowane. Konsekwencją przeżywania gronkowca wewnątrz monocytów i neutrofili może być uruchomienie mechanizmów prowadzących do programowanej śmierci komórkowej – apoptozy [2, 3, 38]. Z kolei inne doniesienia wykazują, że fagocytoza gronkowca złocistego przez neutrofile może powodować opóźnienie śmierci tych komórek [2, 42]. Zainfekowane *S. aureus* makrofagi, nie wykazują symptomów śmierci komórkowej, mają integralną błonę fosfolipidową, aktywne mitochondria i zachowują swoje fizjologiczne funkcje [34]. Ponadto, obserwacje własne wskazują, że makrofagi zainfekowane gronkowcem są odporniejsze niż komórki kontrolne na apoptozę indukowaną różnymi czynnikami. Proces regulacji śmierci komórkowej przez gronkowca jest procesem bardzo złożonym i intensywnie badanym. Przykładowo wykazano, że sekrecja α-toksyny, będącej jednym z kluczowych czynników wirulencji *S. aureus,* indukuje śmierć komórki gospodarza [16, 24]. Wydaje się jednak wielce prawdopodobnym, że również inne komponenty zinternalizowanej, metabolicznie aktywnej bakterii są wymagane do indukcji apoptozy [23].

Z rozmaitością czynników wirulencji i ich wpływu na komórki fagocytujące wiąże się również zróżnicowanie wewnątrzkomórkowego przeżywania gronkowca. Wykazano bowiem, że wewnątrzkomórkowe przeżycie gronkowca jest zależne od fenotypu i genotypu tego patogenu. Badania przeprowadzane przez Van de Velde i wsp. jeszcze pod koniec XIX wieku dowodzą, że szczepy atenuowane mają mniejszą zdolność do przetrwania w surowych warunkach wnętrza makrofaga [32, 39, 48]. Dane te sugerują, że wewnątrzkomórkowe przeżywanie gronkowca jest jednym z mechanizmów wirulencji. Dotychczas przeprowadzono wiele badań z zastosowaniem zmutowanych szczepów *S. aureus*, jednakże nie dają one jednoznacznych wyników. Przykładowo, przetrwanie gronkowca w komórkach śródbłonka jest zależne od ekspresji globalnego regulatora ekspresji genów *agr* (*accessory gene regulator*) i alternatywnego czynnika transkrypcyjnego sigma B (*sigB*), zaś nie od globalnego systemu regulacji transkrypcji czynników wirulencji *sarA* (*staphylococcal accessory regulator*) [23]. Podobną zależność odnotowano w przypadku ludzkich makrofagów, gdzie szczepy gronkowcowe z mutacją w operonie *sarA* charakteryzowały się kinetyką przeżycia wewnątrzkomórkowego zbliżoną do szczepu rodzicielskiego [34]. W sprzeczności z powyższymi danymi są dane Gresham i wsp., które wykazują, że *sarA* jest wymagany do przetrwania gronkowca wewnątrz mysich neutrofili [21]. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być plejotropowa aktywność regulatorowa SarA. Dane literaturowe dowodzą, że wewnątrzkomórkowe przetrwanie jest procesem niezwykle złożonym, determinowanym zarówno przez czynniki wirulencji bakterii (np. α-toksyna, aureolizyna, sortaza A) jak i przez osobnicze predyspozycje gospodarza (np. aktywacja makrofagów wskutek podniesionego poziomu cytokin w surowicy) [34].

3. Udział wewnątrzkomórkowego *S. aureus* w rozwoju infekcji

Większość prac opisujących wewnątrzkomórkowe przeżywanie *S. aureus* zostało wykonanych na wyizolowanych układach *in vitro* [5, 32, 34, 39]. Istnieje natomiast niewiele danych eksperymentalnych opartych na badaniach *in vivo*, głównie z zastosowaniem modelu mysiego, które bezpośrednio udowadniają, że wewnątrzkomórkowe przeżywanie i namnażanie *S. aureus* odgrywa rolę w patogenezie infekcji gronkowcowych [9, 12, 21, 25]. Istotnym argumentem przemawiającym za tą tezą jest fakt wyizolowania z miejsca toczącego się stanu zapalnego komórek (makrofagów, neutrofili) zawierających żywe gronkowce [12, 21]. Przyczyną tak nielicznych udokumentowanych przypadków obecności wewnątrzkomórkowego gronkowca *in vivo* może być zbyt mała ilość komórek bakteryjnych w miejscu infekcji, a przede wszystkim typowe dla infekcji gronkowcowych znaczne uszkodzenie tkanek objętych zakażeniem [13].

Obserwacje kliniczne infekcji *S. aureus* u pacjentów z neutropenią, bądź funkcjonalnym defektem wielojądrzastych leukocytów wskazują na istotną rolę tych komórek układu odpornościowego w obronie organizmu w zakażeniach gronkowcowych [57]. Zostało to potwierdzone w indukowanym *S. aureus* mysim modelu zapalenia stawów. U zainfekowanych gronkowcem myszy pozbawionych granulocytów wykazano wzrost śmiertelności zakażonych osobników korelujący z nasileniem bakteriemii, co wskazuje, że pewna ilość neutrofili jest niezbędna do obrony przeciwgronkowcowej [58]. Z kolei inne prace dowodzą, że wysoka ilość neutrofili sprzyja rozwojowi infekcji bakteryjnej, zaś ograniczenie ich migracji do miejsca infekcji hamuje rozwój zakażenia [10, 21, 35]. Powyższe dane wskazują, że neutrofile mogą mieć zarówno protekcyjny, jak i szkodliwy wpływ na rozwój infekcji gronkowcowej. Ich szkodliwy wpływ może być częściowo tłumaczony właśnie zdolnością *S. aureus* do przeżywania wewnątrz granulocytów [60]. Co więcej, Gresham i wsp. wykazali, że neutrofile badane w układzie *in vivo*

stwarzają dogodne warunki do wewnątrzkomórkowego wzrostu gronkowca i do rozprzestrzeniania się infekcji. Wyizolowane z miejsca toczącej się infekcji granulocyty zawierające żywe gronkowce podano zdrowym myszom, u których zaobserwowano następnie rozwój zakażenia gronkowcowego [21]. Powyższe dane wskazują, że gronkowiec jest w stanie przetrwać wystarczająco długo wewnątrz granulocyta, aby ta wyspecjalizowana w zabijaniu bakterii komórka stała się dla patogena nośnikiem infekcji. Warto zwrócić uwagę na fakt, że wielojądrzaste leukocyty są komórkami krótkożyjącymi, co powoduje, że nie są w stanie brać wydajnego udziału w roznoszeniu bakterii z wrót zakażenia do krwioobiegu [49]. Inaczej jest natomiast w przypadku długożyjących, mobilnych makrofagów, które transportują sfagocytowane bakterie do tkanki limfoidalnej [7, 22]. Komórka makrofaga może stanowić nośnik dla bakterii i umożliwiać jej rozprzestrzenianie po całym organizmie, tak jak ma to miejsce w przypadku *Salmonella* Typhimurium*,* która wędruje w makrofagach z kępek Peyera do węzłów chłonnych, śledziony i wątroby [41, 56] czy *Listeria monocytogenes,* która po penetracji epitelium przewodu pokarmowego namnaża się w makrofagach, co przyczynia się do rozprzestrzenienia tej bakterii w różnych tkankach [14]. Ponieważ gronkowiec złocisty przeżywa przez kilka dni wewnątrz makrofaga, stąd istnieje prawdopodobieństwo, że na tej drodze lokalna gronkowcowa infekcja może się rozprzestrzeniać do układu krwionośnego i atakować cały organizm, co dotychczas jednak nie zostało udowodnione [47].

Lokalne zakażenia gronkowcowe często kończą się ogólnoustrojową inwazją, stąd dalsze zbadanie zjawiska rozprzestrzeniania infekcji gronkowcowej przy udziale komórek układu immunologicznego wydaje się być istotnym zagadnieniem.

4. Modulacja ekspresji genów gospodarza pod wpływem *S. aureus*

Jest wielce prawdopodobne, że wewnątrzkomórkowe gronkowce mają zdolność do stopniowego przejmowania kontroli nad komórkowymi mechanizmami regulacyjnymi (aparat transkrypcyjny) podporządkowując wybrane funkcje komórki własnym celom [8, 44]. Zgodnie z tym założeniem, gronkowcowy mechanizm wirulencji polegałby przykładowo na przystosowaniu wnętrza komórek układu immunologicznego gospodarza do wewnątrzkomórkowego przetrwania, zmieniając tym samym pierwotną funkcję tych komórek. Wyniki kompleksowych analiz zmian transkryptomu makrofagów pod wpływem działania różnych bakterii, przeprowadzonych z zastosowaniem metody mikromacierzy wskazują, że różnorodne patogeny (Gram-dodatnie, Gram-ujemne, mykobakterie) indukują bądź hamują w komórkach transkrypcję podobnych grup genów (receptorów powierzchniowych, cząsteczek sygnałowych, czynników transkrypcyjnych, białek adhezyjnych, enzymów czy białek antyapoptotycznych). Zjawisko to zostało określone mianem „programu aktywacji makrofagów". Dodatkowe badania wykazały, że do indukcji tych zmian wystarczające mogą być jedynie specyficzne antygeny bakteryjne np. LPS, kwas lipotejchojowy, czy dipeptyd muramylowy, będące agonistami receptorów TLRs, zaś nie bakterie *sensu stricte* [44]. Należy zwrócić uwagę, że obserwowane w związku z tym zmiany ekspresji genów w komórkach pod wpływem bakterii mogą być niespecyficzne, będąc skutkiem oddziaływania określonych antygenów bakteryjnych na uniwersalne receptory TLR. W patogenezie poszczególnych gatunków bakterii istotnym natomiast byłoby wykazanie swoiście zależnej od danego patogenu odpowiedzi. Przeprowadzone w tym celu badania porównawcze zmian transkryptomu makrofagów pod wpływem *M. tuberculosis*, *E. coli* i *S. aureus* wykazały, że pomimo wspomnianego powyżej wspólnego programu aktywacji makrofagów, różnice zmian transkyptomu zainfekowanych odmiennymi patogenami makrofagów są jednak rozróżnialne. Po fagocytozie *S. aureus* zanotowano m.in. spadek ekspresji genów kodujących białka cytoszkieletu, zaś wzrost negatywnych regulatorów genów związanych z przekazem sygnału przez białka G [44]. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku ekspozycji neutrofili na różnorodne patogeny, przy czym zanotowano tylko nieliczne zależne od typu patogenu, swoiste zmiany ekspresji genów [8]. Analogiczną zależność stwierdzono *in vivo* na mysim modelu posocznicy indukowanej *S. aureus* i *E. coli*, gdzie z pośród 6 144 oznaczanych genów znaleziono znaczące różnice w poziomie ekspresji jedynie w przypadku 17 genów [61]. Natomiast w badanych próbkach klinicznych pobranych od pacjentów z posocznicą wywołaną patogenami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi nie stwierdzono zmian [55].

Chociaż rola receptorów TLR jest w procesie regulacji transkrypcji genów gospodarza niepodważalna, to dane literaturowe wskazują na alternatywną drogę przekazu sygnału [8, 44]. Zostało to wykazane na przykładzie wewnątrzkomórkowego patogenu – *Bordetella pertussis*. Boldrick i wsp. udowodnili znaczną różnicę w profilu ekspresji genów ludzkich jednojądrzastych komórek krwi po fagocytozie żywych i martwych bakterii [8]. Szybka i wysoka indukcja ekspresji genów kodujących: TNFα, MIP1β, IL-1α, IL-1β została zahamowana w komórkach fagocytujących żywe bakterie, w przeciwieństwie do komórek ze sfagocytowanymi martwymi bakteriami, w których wysoka ekspresja wymienionych genów została podtrzymana.

Wynik ten wskazuje na zdolność żywych patogenów do zahamowania produkcji białek mających działanie antybakteryjne. Udział w alternatywnej do TLR drodze oddziaływania na komórki gospodarza mogłyby mieć białka z rodziny NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) będące wewnątrzkomórkowymi receptorami dla molekularnych wzorców związanych z patogenami (PAMPs – ang. *pathogen associated molecular patterns*) [29]. W wewnątrzkomórkowym rozpoznaniu gronkowca postuluje się udział Nod2 wiążącego dipeptyd muramylowy [17].

Badanie zmian ekspresji genów komórek gospodarza pod wpływem sfagocytowanych bakterii pozwala wyjaśnić szereg obserwowanych zjawisk klinicznych związanych z aktywnością tych komórek, jak chociażby tendencje do wywoływania ostrych bądź chronicznych infekcji. Innym przykładem jest gwałtowna indukcja apoptozy w neutrofilach pod wpływem sfagocytowanego *S. aureus,* tłumaczona wzrostem ekspresji genów bezpośrednio zaangażowanych w inicjację i egzekucję procesu apoptozy, takich jak np.: TNFα, czy TNFSF10 [33].

5. Podsumowanie

Pomimo prowadzonych w ostatnich latach, zakrojonych na szeroką skalę badań nad etiologią zakażeń *S. aureus*, gatunek ten pozostaje jednym z najgroźniejszych patogenów organizmu człowieka. Gronkowiec złocisty rezydujący wewnątrz komórek gospodarza, może się przyczyniać do powtarzających się gronkowcowych nieżytów nosa, czy nawrotu infekcji po terapii antybiotykowej [11, 36]. Co więcej, obecnie notuje się dramatycznie rosnącą ilość szczepów gronkowcowych opornych na znane i powszechnie stosowane antybiotyki. Obok metycylinoopornych (MRSA – *methicilin-resistant S. aureus*), czy niewrażliwych na glikopeptydy (GISA – *glycopeptide-intermediate S. aureus*) zanotowano również pojawienie się szczepów opornych na wankomycynę (VRSA – *vancomycin-resistant S. aureus*) [27, 62]. W związku z powyższym zagadnienie przeżywania *S. aureus* wewnątrz komórek gospodarza, jest obecnie intensywnie badane, a prowadzone badania koncentrują się przede wszystkim wokół wpływu leków i potencjalnych terapeutycznych związków na wewnątrzkomórkową proliferację tych bakterii [4, 46, 51].

Na zakończenie należy wspomnieć, że wiele doniesień dotyczących wewnątrzkomórkowego przeżywania gronkowca koncentruje się na fenotypie SCVs (*small-colony variants*) – wolno rosnącej subpopulacji *S. aureus*, o obniżonej aktywności metabolicznej opornej na działanie antybiotyków powodującej przewlekłe i nawracające infekcje [59].

Zważywszy, na wciąż niebezpieczne, nawracające się infekcje oraz pojawiające się zmutowane szczepy bakterii, poznanie mechanizmu wewnątrzkomórkowego przeżywania gronkowca złocistego w komórkach układu immunologicznego, wydaje się być istotnym krokiem do stworzenia w pełni skutecznej terapii przeciwgronkowcowej.

Piśmiennictwo

1. Archer G.L.: *Staphylococus aureus*: A well-armed pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 1179–1181 (1998)
2. Baran J., Guzik K., Hryniewicz W., Ernst M., Flad H.D., Pryjma J.: Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.* **64**, 4242–4248 (1996)
3. Baran J., Weglarczyk K., Mysiak M., Guzik K., Ernst M., Flad H.D., Pryjma J.: Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**, 1287–1297 (2001)
4. Barcia-Macay M., Seral C., Tulkens P.M.: Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 841–851 (2006)
5. Baughn R., Bonventre P.F.: Phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by normal mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **12**, 346–352 (1975)
6. Bayles K.W., Wesson C.A., Liou L.E., Fox L.K., Bohach G.A., Trumble W.R.: Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**, 336–42 (1998)
7. Bellingan G.J., Caldwell H., Howie S.E.M., Dransfield I., Haslett C.: *In vivo* fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J. Immunol.* **157**, 2577–2585 (1996)
8. Boldrick J.C., Alizadeh A.A., Diehn M., Dudoit S., Liu C.L., Belcher C.E., Botstein D., Staudt L.M., Brown P.O., Relman D.A.: Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 972–977 (2002)
9. Brouillette E., Grondin G., Shkreta L., Lacasse P., Talbot B.G.: *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb. Pathog.* **35**, 159–168 (2003)
10. Caver T.E., O'Sullivan F.X., Gold L.I., Gresham H.D.: Intracellular demonstration of active TGFbeta1 in B cells and plasma cells of autoimmune mice. IgG-bound TGFbeta1 suppresses neutrophil function and host defense against *Staphylococcus aureus* infection. *J. Clin. Invest.* **98**, 2496–2506 (1996)
11. Clement S., Vaudaux P., Francois P., Schrenzel J., Huggler E., Kampf S., Chaponnier C., Lew D., Lacroix J.S.: Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J. Infect. Dis.* **192**, 1023–1028 (2005)
12. Craven N., Anderson J.C.: Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action *in vitro* and *in vivo*. *J. Dairy Res.* **51**, 513–523 (1984)

13. Craven N., Anderson J.C.: The location of *Staphylococcus aureus* in experimental chronic mastitis in the mouse and the effect on the action of sodium cloxacillin. *Br. J. Exp. Pathol.* **60**, 453–459 (1979)
14. Drevets D.A.: Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect. Immun.* **67**, 3512–3517 (1999)
15. Dziewanowska K., Patti J.M., Deobald C.F., Bayles K.W., Trumble W.R., Bohach, G.A.: Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**, 4673–4678 (1999)
16. Essmann F., Bantel H., Totzke G., Engels I.H., Sinha B., Schulze-Osthoff K., Jänicke R.U.: *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ.* **10**, 1260–1272 (2003)
17. Fournier B., Philpott D.J.: Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 521–540 (2005)
18. Fowler T., Johansson S., Wary K.K., Hook M.: Src kinase has a central role in *in vitro* cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol.* **5**, 417–426 (2003)
19. Fowler T., Wann E.R., Joh D., Johansson S., Foster T.J., Hook M.: Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta-1-integrins. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 672–679 (2000)
20. Goebel W., Kuhn M.: Bacterial replication in the host cell cytosol. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 49–53 (2000)
21. Gresham H.D., Lowrance J.H., Caver T.E., Wilson B.S., Cheung A.L., Lindberg F.P.: Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.* **164**, 3713–3722 (2000)
22. Harmsen A.G., Muggenburg B.A., Snipes M.B., Bice D.E.: The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science*, **230**, 1277–1280 (1985)
23. Haslinger-Löffler B., Kahl B.C., Grundmeier M., Strangfeld K., Wagner B., Fischer U., Cheung A.L., Peters G., Schulze-Osthoff K., Sinha B.: Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol.* **7**, 1087–1097 (2005)
24. Haslinger B., Strangfeld K., Peters G., Schulze-Osthoff K., Sinha B.: *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol.* **5**, 729–741 (2003)
25. Hebert A., Sayasith K., Senechal S., Dubreuil P., Lagace J.: Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 57–62 (2000)
26. Hess D.J., Henry-Stanley M.J., Erickson E.A., Wells C.L.: Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. *J. Surg. Res.* **114**, 42–49 (2003)
27. Hiramatsu K.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* **1**, 147–155 (2001)
28. Hudson M.C., Ramp W.K., Nicholson N.C., Williams A.S., Nousiainen M.T.: Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* **19**, 409–419 (1995)
29. Inohara N., Nuńez G.: NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 371–382 (2003)
30. Jakab G.J., Green G.M.: Defect in intracellular killing of *Staphylococcus aureus* within alveolar macrophages in Sendai virus-infected murine lungs. *J. Clin. Invest.* **57**, 1533–1539 (1976)
31. Kahl B.C., Goulian M., van Wamel W., Herrmann M., Simon S.M., Kaplan G., Peters G., Cheung A.L.: S.a RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect. Immun.* **68**, 5385–5392 (2000)
32. Kapral F., Shayegani F.: Intracellular survival of staphylococci. *J. Exp. Med.* **110**, 123–138 (1959)
33. Kobayashi S.D., Braughton K.R., Whitney A.R., Voyich J.M., Schwan T.G., Musser J.M., DeLeo F.R.: Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 10948–10953 (2003)
34. Kubica M., J. Potempa i wsp.: A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* **3**, e1409 (2008) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
35. Lowrance J.H., O'Sullivan F.X., Caver T.E., Waegell W., Gresham H.D.: Spontaneous elaboration of transforming growth factor beta suppresses host defense against bacterial infection in autoimmune MRL/lpr mice. *J. Exp. Med.* **180**, 1693–1703 (1994)
36. Lowy F.D.: Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol.* **8**, 341–343 (2000)
37. Lowy F.D.: *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**, 520–532 (1998)
38. Lundqvist-Gustafsson H., Norrman S., Nilsson J., Wilsson A.: Involvement of p38-mitogen-activated protein kinase in *Staphylococcus aureus*-induced neutrophil apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 642–648 (2001)
39. Melly M., Thomison J., Rogers D.: Fate of staphylococci with human leukocytes. *J. Exp. Med.* **112**, 1121–1130 (1960)
40. Menzies B.E., Kourteva I.: Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect. Immun.* **66**, 5994–5998 (1998)
41. Monack D.M., Hersh D., Ghori N., Bouley D., Zychlinsky A., Falkow S.: *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J. Exp. Med.* **192**, 249–258 (2000)
42. Moulding D.A., Walter C., Hart C.A., Edwards S.W.: Effects of staphylococcal enterotoxins on human neutrophil functions and apoptosis. *Infect. Immun.* **67(5)**, 2312–2318 (1999)
43. Murray R.J.: Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern. Med. J.* **35**, 106–119 (2005)
44. Nau G.J., Richmond J.F., Schlesinger A., Jennings E.G., Lander E.S., Young R.A. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**,1503–1508 (2002)
45. Nuzzo I., Sanges M.R., Folgore A., Carratelli C.R.: Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 235–240 (2000)
46. Onyeji C.O., Nightingale C.H., Marangos M.N.: Enhanced killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human macrophages by liposome-entrapped vancomycin and teicoplanin. *Infection*, **22**, 338–342 (1994)
47. Petti C.A., Fowler V.G.: *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *Cardiol. Clin.* **21**, 219–233 (2003)
48. Rogers D.E., Tompsett R.: The survival of staphylococci within human leukocytes. *J. Exp. Med.* **95**, 209–230 (1952)

49. Savill J., Haslett C., Fate of Neutrophils. In Immunopharmacology of Neutrophils, red. P.G. Hellewell, T.J. Williams, Academic Press Inc., 1994, s. 295–314
50. Schnaith A., Kashkar H., Leggio S.A., Addicks K., Kronke M., Krut O. *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J. Biol. Chem.* **282**, 2695–2706 (2007)
51. Seral C., Van Bambeke F., Tulkens P.M.: Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2283–2292 (2003)
52. Sinai A.P., Joiner K.A.: Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Ann. Rev. Microbiol.* **51**, 415–462 (1997)
53. Sinha B., François P.P., Nüsse O., Foti M., Hartford O.M., Vaudaux P., Foster T.J., Lew D.P., Herrmann M., Krause K.H.: Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol.* **1**, 101–117 (1999)
54. Stuart L.M., Deng J., Silver J.M., Takahashi K., Tseng A.A., Hennessy E.J., Ezekowitz R.A., Moore K.J.: Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* **170(3)**, 477–485 (2005)
55. Tang B.M., McLean A.S., Dawes I.W., Huang S.J., Cowley M.J., Lin R.C.: Gene-expression profiling of gram-positive and gram-negative sepsis in critically ill patients. *Crit. Care Med.* **36**, 1125–1128 (2008)
56. Vazquez-Torres A., Jones-Carson J., Baumler A.J., Falkow S., Valdivia R., Brown W., Le M., Berggren R., Parks W.T., Fang F.C.: Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, **401**, 804–808 (1999)
57. Venditti M., Falcone M., Micozzi A., Carfagna P., Taglietti F., Serra P.F., Martino P.: *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with hematologic malignancies: a retrospective case-control study. *Haematologica*, **88**, 923–930 (2003)
58. Verdrengh M., Tarkowski A.: Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **65**, 2517–2521 (1997)
59. von Eiff C., Heilmann C., Proctor R.A., Woltz C., Peters G., Gotz F.: A site-directed *Staphylococcus aureus* hemB mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J. Bacteriol.* **179**, 4706–4712 (1997)
60. Voyich J.M., F.R. DeLeo i wsp.: Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J. Immunol.* **175**, 3907–3919 (2005) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
61. Yu S.L., Chen H.W., Yang P.C., Peck K., Tsai M.H., Chen J.J., Lin F.Y.: Differential gene expression in gram-negative and gram-positive sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 1135–1143 (2004)
62. Zetola N., Francis J.S., Nuermberger E.L., Bishai W.R.: Community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect. Dis.* **5(5)**, 275–286 (2005)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 401–406
http://www.pm.microbiology.pl

UDZIAŁ BAKTERII W PATOMECHANIZMACH PRZEWLEKŁYCH ZAPALEŃ JELIT

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Magdalena Strus[1]*, Elizabeth Hultgren Hornquist[2], Lena Ohman[2], Piotr B. Heczko[1]

[1] Katedra Mikrobiologii Collegium Medium, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, ul. Czysta 18, 31-121 Kraków
[2] Instytut Klinicznej Immunologii i Patologii, Uniwersytet w Goeteborgu, Szwecja
* Autor korespondencyjny: e-mail: mbstrus@cyf-kr.edu.pl

1. Wprowadzenie. 2. Etiologia i patogeneza IBD. 3. Zwierzęce modele IBD. 4. Badania własne. 5. Dyskusja

Contribution of bacteria to the pathomechanisms of chronic inflammatory bowel disease

Abstract: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are recently being considered as two forms of the same condition known as inflammatory bowel disease (IBD). The main aim of this work was to study the quantitative changes taking place in the composition of the gastrointestinal tract microflora during exacerbation of clinical symptoms of inflammation in the gastrointestinal tract, based on the tests done in the Gαi2 model mice of IBD. In case of the Gαi2 mice model, in the intestinal biopsies collected from the affected mice, we observed a global increase in the bacterial counts but also in the number of gram negative rods, enterococci and streptococci as well lactic acid bacteria. In the intestinal content, there was a significant rise in the number of gram negative rods as well enterococci and streptococci. Using the Gαi2 IBD animal model we were able to demonstrate a correlation between the increasing inflammatory state verified in the intestinal mucosal biopsies by means of histopathological methods and the growing number of bacteria adhering to the mucosa, especially gram negative rods, streptococci, enterococci and lactobacilli

1. Introduction. 2. Etiology and pathogenesis of IBD. 3. Animal models of IBD. 4. Self research results. 5. Discussion

Słowa kluczowe: *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, model zwierzęcy, przewlekłe stany zapalne jelit
Key words: *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, animals models, inflammatory bowel disease (IBD)

1. Wprowadzenie

Choroba Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) oraz *colitis ulcerosa* (CU) zwana wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) są uważane ostatnio za dwie postacie jednego schorzenia, określanego wspólnym mianem nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ), po angielsku Inflammatory Bowel Disease – (IBD).

Choroba Leśniowskiego-Crohna to przewlekłe, nieswoiste zapalenie ściany przewodu pokarmowego. Może dotyczyć każdej części przewodu pokarmowego, od jamy ustnej (np. owrzodzenie języka) do odbytu.

U pacjentów z *colitis ulcerosa* obserwuje się objawy ogólne – chudnięcie, osłabienie, stany gorączkowe. Charakterystycznymi objawami tego stanu zapalnego są luźne stolce, które początkowo mogą zawierać niewielką domieszkę krwi, ale przy intensywnym nasileniu choroby w stolcu może być widoczny wręcz sam śluz z krwią. Przy tego rodzaju biegunkach najczęściej dochodzi do utraty masy ciała, gorączki oraz ogólnego osłabienia organizmu. Choroba przebiega najczęściej w postaci lekkich, średnio ciężkich lub ciężkich rzutów przedzielonych okresami remisji.

Dane epidemiologiczne wskazują, że w krajach uprzemysłowionych o wysokim dochodzie przypadającym na jednego mieszkańca odnotowuje się w ostatnich 30 latach niepokojący wzrost przypadków obu postaci IBD. Dotyczy to np. krajów skandynawskich, Anglii, oraz krajów Ameryki Północnej: Kanady i Stanów Zjednoczonych, w których odnotowuje się średnią zapadalność na WZJG w wysokości 20 przypadków/100 tysięcy, zaś na chorobę Leśniowskiego-Crohna 5–7 przypadków/100 tysięcy [23].

W Polsce, w oparciu o badania retrospektywne przeprowadzone na terenach południowo-wschodnich, zaobserwowano obniżenie wieku wystąpienia objawów IBD u dzieci. Odnotowano też wzrost chorobowości IBD z poziomu 0.65/100 000 dzieci w latach 1992–96 do 1.14/100 000 w latach 1996–2000. Tak szybki wzrost chorobowości może budzić szczególny niepokój ze względu na ciężkie rokowania i kosztowne leczenie.

2. Etiologia i patogeneza IBD

Przebieg IBD cechuje się samoistnymi remisjami i nawrotami, których przyczyna pozostaje nadal nie do końca wyjaśniona. Na podstawie licznych obserwacji klinicznych, a także w oparciu o badania prowadzone na zwierzęcych modelach IBD, stawiana jest spójna hipoteza, że do rozwoju przewlekłego zapalenia jelit dochodzi w momencie współistnienia trzech czynników to jest:

- predyspozycji genetycznych pacjenta,
- zaburzeń funkcjonowania układu odpornościowego (w tym przerwania bariery śluzówkowej),
- oddziaływania szeregu czynników środowiskowych (w tym mikroflory przewodu pokarmowego [6].

Podłoże genetyczne. Za istotną rolą genetycznego podłoża nieswoistych zapaleń jelit przemawia fakt, że w tej samej rodzinie mogą występować zarówno przypadki choroby Leśniowskiego-Crohna, jak i *colitis ulcerosa* [25]. Ponadto wiadomo, że ryzyko zachorowania na *colitis ulcerosa* jest 10-krotnie wyższe u członków rodzin chorych na tę chorobę niż w pozostałej populacji. Tak więc zakłada się, że do rozwoju IBD dochodzi tylko u osób predysponowanych genetycznie. W ostatnich latach ustalono położenie kilku genów związanych z podatnością na tę chorobę w obrębie chromosomów 1, 5, 6, 12, 14, 16, 19 [1].

Zaburzenia funkcjonowania komórek układu immunologicznego. Zaburzenia prawidłowego funkcjonowania komórek układu immunologicznego są bez wątpienia jednym z podstawowych elementów odpowiedzialnych za pojawienie się obu postaci IBD. Podejrzewa się, że do rozwoju procesu zapalnego dochodzi w momencie, gdy zaburzeniu ulega jeden z dwóch kierunków interakcji pomiędzy komórkami nabłonkowymi a komórkami układu immunologicznego występującymi w warstwie podścieliskowej (tzw. *lamina propria*). W pierwszym przypadku przypuszcza się, że proces zapalny rozpoczyna się od warstwy podścieliskowej, w której pobudzone komórki układu immunologicznego bezpośrednio wpływają na zmianę funkcji oraz procesy podziałowe komórek nabłonkowych. W drugim zakłada się, że najpierw dochodzi do przerwania bariery śluzówkowej i do zaburzenia funkcji przepuszczalności nabłonka jelitowego, co w konsekwencji prowadzi do swobodnego przepływu znacznej liczby różnych antygenów ze światła jelita do *lamina propria* [18, 19].

Bariera śluzówkowa. Prawidłowe wydzielanie odpowiedniej jakości śluzu na poszczególnych piętrach przewodu pokarmowego odgrywa bardzo ważną rolę w zachowaniu tzw. bariery śluzówkowej, która chroni komórki gospodarza przed działaniem wielu czynników środowiskowych, w tym chorobotwórczych patogenów przewodu pokarmowego. W oparciu o liczne badania, prowadzone zarówno na nowotworowych liniach tkankowych, jak i na modelach zwierzęcych udowodniono, iż bariera śluzówkowa generalnie zatrzymuje penetrację większości drobnoustrojów chorobotwórczych, w tym enteropatogennych szczepów *Escherichia coli*, rotawirusów, czy *Entamoeba histolytica* [4, 15, 26]. Nawet w przypadku *Helicobacter pylori* Kamisago udowodnił w badaniach *in vitro* wyraźny spadek adherencji klinicznych izolatów *H. pylori* do nowotworowej linii komórek żołądkowych pokrytej uprzednio wypreparowanym śluzem [11]. U pacjentów, u których stwierdzono rozwój ChL-C lub WZJG zaznaczają się wyraźne zmiany w budowie fizyko-chemicznej i konsystencji śluzu, a przede wszystkim grubości bariery śluzówkowej. Ponadto, u tych pacjentów odnotowuje się wzrost aktywności enzymów degradujących śluz, tzw. mucynaz, których pochodzenie nie jest jeszcze do końca wyjaśnione. Większość autorów uważa, że są one pochodzenia bakteryjnego, a ich wzrost spowodowany jest liczbowym zwiększeniem się całkowitej populacji bakterii przywartych do nabłonka jelita grubego [8].

Oddziaływanie czynników środowiskowych. Wśród czynników środowiskowych, mogących uczestniczyć w uruchamianiu procesu zapalnego wymienia się, oprócz pewnych antygenów pokarmowych, przede wszystkim bakterie wchodzące w skład flory komensalnej, stale kolonizujące ludzki przewód pokarmowy.

Analizując wpływ mikroflory na rozwój i przebieg zarówno ChL-C, jak i CU początkowo sądzono, że uda się wyizolować pojedynczy czynnik etiologiczny bezpośrednio odpowiedzialny za rozwój IBD. Pod uwagę brano pałeczki Gram-ujemne, takie jak: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* i o *Listeria monocytogenes*. Szczególną rolę przypisywano atypowym prątkom z rodzaju *Mycobacterium* z uwagi na występowanie u pacjentów z ostrymi objawem choroby Leśniowskiego-Crohna ziarniny przypominającej ziarninę gruźliczą.

Tabela I

Wybrane czynniki etiologiczne podejrzewane o udział w patogenezie choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

Choroba Leśniowskiego-Crohna	*Colitis ulcerosa*
Chlamydia	*Shigella*
Pseudomonas maltophilia	Różne wirusy RNA
Mycobacterium paratuberculosis	*Escherichia coli*
Reowirusy	*Salmonella*
Paramyksowirusy	*Yersinia sp.*
Listeria monocytogenes	*Campylobacter jejuni*

Nigdy jednak nie udało się wykryć u chorych wymienionych bakterii w wyraźnie zwiększonych populacjach. Powszechne wprowadzenie do badań zwierzęcych modeli IBD oraz oparcie się na nowoczesnych metodach molekularnych doprowadziło do zmiany samej koncepcji udziału bakterii w IBD, a mianowicie pojawiły się doniesienia mówiące o istotnym znaczeniu całej mikroflory jelita grubego, a nie jedynie pojedynczego czynnika etiologicznego [9, 14]. Tak więc, przez kilka ostatnich lat w pracach poświęconych tym zagadnieniom obserwuje się nowy kierunek badawczy. Analizuje się głównie jakościowe i ilościowe zmiany zachodzące we florze bakteryjnej, zarówno treści jelitowej, jak i zmienionych procesem zapalnym wycinków jelita, pobranych od pacjentów z ChL-C, jak i WZJG.

3. Zwierzęce modele IBD

Na przełomie lat 70, dzięki opracowaniu przez genetyków modeli zwierzęcych dla niektórych jednostek chorobowych, w tym IBD, zanotowano istotny postęp w zbieraniu i analizowaniu podstawowych informacji. Pozwalają one na śledzenie przebiegu tej choroby wraz z oceną narastania zmian chorobowych powstających w wyniku zaburzeń mechanizmów funkcjonowania organizmu w warunkach *in vivo.*

Dobrze scharakteryzowanym pod względem genetycznym i funkcjonalnym modelem IBD jest mysi model Gαi2. U tych zwierząt, na skutek celowanej mutacji w zakresie genu kodującego białko G, dochodzi do dysfunkcji limfocytów T. Białka G stanowią rodzinę heterotrimerów białkowych zawierających podjednostki α, β i Δ, które dzięki interakcjom z różnymi receptorami, uczestniczą w transdukcji sygnałów międzykomórkowych [5]. U myszy homozygotycznych rozwija się w ciągu kilku do kilkunastu tygodni od urodzenia proces zapalny jelita przypominający bardzo ludzką postać *colitis ulcerosa* [20].

Dzięki zastosowaniu metody hodowli zwierząt w warunkach jałowych (zwierzęta germ-free lub gnotobiotyczne) wykazano, że obecność bakterii zasiedlających jelito jest niezbędna do wywołania zmian zapalnych. Zaobserwowano, że zwierzęta genetycznie predysponowane do IBD nie miały zapalenia, jeśli były pozbawione mikroorganizmów, natomiast przywrócenie mikroflory jelita powodowało wystąpienie zapalenia. Wprowadzenie możliwości hodowli gryzoni w warunkach ograniczonego dopływu bakterii z zewnątrz, czyli w tzw. warunkach specific pathogen free (SPF) oraz skolonizowanie takich zwierząt za pomocą sztucznie przygotowanych przez człowieka mieszanin wybranych gatunków bakterii, tzw. florą Schaedlera, pozwoliło na potwierdzenie hipotezy, że stała mikroflora jelita jest niezbędnym, ale i wystarczającym czynnikiem powodującym powstawanie zmian zapalnych jelita [21].

W Katedrze Mikrobiologii UJCM w Krakowie od 2000 roku prowadzone są intensywne badania nad udziałem wybranych rodzajów i gatunków bakterii, wchodzących w skład komensalnej flory przewodu pokarmowego w podtrzymywaniu przewlekłego stanu zapalnego jelit. Badania prowadzono na mysim modelu IBD tj. Gαi2 w ramach grantu Unii Europejskiej – QLGI-1999-00050 zatytułowanego: „Badania nad udziałem flory jelitowej w patogenezie przewlekłych zapaleń jelit w oparciu o modele zwierzęce".

4. Badania własne

4.1. Materiał i metody

Myszy Gαi2 przebywały w warunkach SPF (Specific Pathogen Free) w zwierzętarni Instytutu Klinicznej Immunologii i Patologii Uniwersytetu w Goeteborgu. W tym modelu IBD do manifestacji objawów klinicznych dochodziło samoistnie, tylko u osobników homozygotycznych, w kilka do kilkunastu tygodni po urodzeniu. Do badania włączono 56 homozygotycznych myszy, które co tydzień były parami usypiane i uśmiercane, a następnie poddawane sekcji i badaniom histopatologicznym. W ten sposób otrzymano materiały zarówno od zwierząt z początkowymi stadiami rozwoju zapalenia jelit, jak i z pełnymi objawami IBD tj. krwawej biegunki, spadku masy ciała, braku łaknienia. Kontrolę stanowiło 14 myszy heterozygotycznych, u których nie doszło do rozwoju stanu zapalnego jelit. U myszy Gαi2 przeprowadzono na fragmentach tkanek ocenę histopatologiczną (przeanalizowano przerost nabłonka, utratę komórek kubkowych oraz naciek zapalny w błonie podstawowej) [2]. U kilku wybranych myszy Gαi2 (z objawami i bez objawów IBD) dodatkowo analizowano na przekroju poprzecznym jelita grubość warstwy śluzowej stosując do tego celu fluorescencyjny barwnik błękit Alcianu [3]. Badania na zwierzętach uzyskały zgodę lokalnych komisji bioetycznych.

4.2. Badania mikrobiologiczne

Celem wykonania badań mikrobiologicznych w mysim modelu IBD pobierano odcinek przewodu pokarmowego od wpustu żołądka do dystalnej części prostnicy (przed fragmentem wyciętym do badania histopatologicznego). Z obu końców odcinek ten był podwiązywany jałowymi nićmi chirurgicznymi, a całość natychmiast umieszczana w jałowym pojemniku zawierającym 50 ml płynnego podłoża Schaedlera (SAB, Difco, USA) z 10% glicerolem. Pobrany materiał zamrażano do temperatury –80°C, a następnie w głębokim zamrożeniu transportowano do Zakładu Bakteriologii Collegium Medicum. Po dostarczeniu, próbki były delikatnie rozmrażane, następnie z dystalnej części jelita grubego na wysokości 3 cm od odbytu pobierano fragment długości 1 cm, z którego usuwano jego treść, przenosząc ją do wytarowanej probówki zawierającej 10 ml bulionu Schaedlera, a następnie całość ważono. Odcinek jelita dokładnie przepłukiwano w 10 ml PBS w celu usunięcia pozostałości flory planktonowej, umieszczano w wytarowanej probówce zawierającej 1 ml bulionu Schaedlera i również ważono. Zarówno treść jelitową, jak i tkankę jelita bardzo starannie rozdrabniano za pomocą szklanego moździerza. Powyższe czynności przeprowadzano w warunkach jałowych w komorze przeznaczonej do hodowli w warunkach beztlenowych (MACS-MG 500 Work Station, DW Scientific, UK) w atmosferze N2 (85%), H2 (10%) i CO2 (5%). Z tak przygotowanych materiałów wykonywano rozcieńczenia dziesiętne w probówkach zawierających po 1 ml bulionu Schaedlera, a następnie z każdego rozcieńczenia wysiewano po 100 ml badanego materiału na

Tabela II

Wykaz podłoży stosowanych do hodowli materiału pochodzących z przewodu pokarmowego

Podłoża przeznaczone do hodowli flory tlenowej i beztlenowej	Izolowane rodzaje bakterii i grzybów	Czas inkubacji w godz.
McConkey Agar (Oxoid)	*Enterobacteriaceae*	24
Columbia Agar (Difco) z 5%krwią baranią	*Staphylococcus, Streptococcus*	24
Enterococcosel Agar (BBL)	*Enterococcus*	24
MRS Agar (Oxoid)	*Lactobacillus*	24–48
Columbia Agar (Difco) z 5% krwią baranią i witaminą K	*Bacteroides* oraz inne nie sporujące beztlenowce	48–72
Reinforced Clostridia Agar (Oxoid)	*Clostridium*	48
Columbia Agar z selektywnym suplementem (Oxoid)	*Helicobacter*, *Campylobacter*	72–96
Sabouraud Agar (bioMerieux)	Grzyby	24

odpowiednie, stałe podłoża wzrostowe. Zestaw podłóż podano w tabeli 2.

Płytki umieszczano w odpowiednich warunkach inkubacji tj. tlenowych lub beztlenowych, przy czym inkubację beztlenową przeprowadzano w komorze MACS-MG 500 Work Station, DW. Różnice liczebności populacji poszczególnych grup bakterii dla myszy Gαi2 z objawami i bez objawów IBD oceniano statystycznie za pomocą testu Manna-Whitneya, wykorzystując program statystyczny – Statistica (StatSoft Inc. USA).

4.3. Wyniki badań własych

Po przeanalizowaniu zmian zachodzących w mikroflorze jelita grubego u myszy Gαi2, pod wpływem IBD, wyciągnięto następujące wnioski:

1. W mysim modelu Gαi2, w materiałach z tkanek jelitowych pobranych od chorych myszy, wystąpiła znamiennie wyższa, globalna liczba bakterii, ale również liczby pałeczek Gram-ujemne, paciorkowców z rodzajów *Enterococcus* i *Streptococcus* oraz bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. W materiałach pochodzących z treści jelitowej odnotowano jedynie wyższą liczbę pałeczek Gram-ujemnych oraz paciorkowców *Enterococcus* i *Streptococcus*..
2. Na przekroju poprzecznym jelita grubego chorych myszy zaobserwowano zanik warstwy śluzowej na powierzchni nabłonka jelitowego oraz przemieszczenie się flory bakteryjnej ze światła jelita w kierunku nabłonka.

5. Dyskusja

Zastosowanie zwierzęcych modeli przewlekłych stanów zapalnych jelit oraz skolonizowanie ich za pomocą sztucznie przygotowanych przez człowieka mieszanin wybranych gatunków bakterii tzw. florą

Tabela III

Porównanie liczebności populacji poszczególnych grup bakterii (c.f.u/gram) wyizolowanych z tkanki jelita oraz treści jelitowej zdrowych i chorych myszy Gαi2

Grupy bakterii	Liczba bakterii [c.f.u/gram] wyizolowana u zdrowych myszy Gαi2 n = 14	Liczba bakterii [c.f.u/gram] wyizolowana u chorych myszy Gαi2. n = 56	Znamienność statystyczna
	Tkanka jelitowa	Tkanka jelitowa	
Globalna liczba bakterii	$2{,}02\times10^{7}$	$7{,}33\times10^{9}$	p=0,0264
Pałeczki Gram-ujemne	2×10^{3}	6.7×10^{6}	p<0.000065
Enterococcus i *Streptococcus*	2×10^{5}	2×10^{7}	p<0.000001
Staphylococcus	1×10^{4}	6×10^{4}	ns (p>0,05)
Lactobacillus	2×10^{7}	$7{,}3\times10^{9}$	p<0.000007
Bakterie beztlenowe	1×10^{3}	1×10^{3}	ns (p>0,05)
	Treść jelitowa	Treść jelitowa	
Globalna liczba bakterii	$1{,}01\times10^{9}$	$2{,}18\times10^{9}$	ns (p>0,05)
Pałeczki Gram-ujemne	8×10^{4}	5×10^{7}	p<0.008
Enterococcus i *Streptococcus*	7×10^{6}	2.3×10^{8}	p<0.005
Staphylococcus	1.3×10^{6}	1×10^{6}	ns (p>0,05)

ns – brak istotności

Schaedlera, pozwoliło na potwierdzenie hipotezy, że stała mikroflora jelita jest niezbędnym czynnikiem powodującym powstawanie zmian zapalnych w IBD [17].

W mysim modelu IBD- Gαi2, pomimo, że skład jakościowy bakterii był niemalże identyczny, doszło do rozwoju stanu zapalnego. Świadczyć to może o mniejszym znaczeniu poszczególnych rodzajów czy gatunków bakterii w porównaniu z całą florą w rozwoju IBD. Nie wyklucza to ich nierównego udziału w tym procesie, co może przejawiać się np. przyrostem liczbowym jednych populacji bakterii względem drugich. W badaniach ilościowych stwierdzono znamienny przyrost liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* zaadherowanych do powierzchni nabłonka jelit u myszy z rozwiniętym stanem zapalnym jelit w porównaniu z myszami zdrowymi.

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowią jeden z dominujących składników flory przewodu pokarmowego gryzoni i tak np. w jelicie grubym liczebność tej populacji może wynosić $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ c.f.u/gram [22]. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano wyraźny wzrost populacji *Lactobacillus* w chorej tkance jelita grubego, przekraczający średnie wartości podane przez grupę T a n n o c k a prawie o 2 log. Można się zastanawiać, dlaczego właśnie ta grupa bakterii, zaliczana do niechorobotwórczych rodzajów bakterii należących do flory jelita gryzoni, zwiększa istotnie swoją populację w chorych tkankach. Dzieje się tak prawdopodobnie dzięki wytworzeniu na powierzchni komórki pewnych mechanizmów (np. produkcji egzopolisacharydu), które ułatwiają adherencję tych bakterii do odsłoniętego nabłonka jelita gospodarza. Jako bakterie stale kolonizujące jelito gryzoni, bakterie z rodzaju *Lactobacillus* podlegają w stanie zdrowia tolerancji immunologicznej, pozwalającej za „zgodą" gospodarza na przemieszczanie się bakterii w kierunku nabłonka celem zajmowania wolnych receptorów na jego powierzchni. Tym samym, zmniejsza się zdolność do adherencji pozostałych, bardziej chorobotwórczych składników flory jelita lub zdefiniowanych patogenów. Oprócz takiego blokowania receptorów, bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są w stanie selektywnie hamować namnażanie się niektórych innych składników flory, bowiem większość szczepów *Lactobacillus* produkuje swoiste peptydy antybakteryjne, zwane dawniej bakteriocynami, a obecnie lantybiotykami [24].

Analizując pozostałe zmiany liczbowe, zachodzące w populacjach bakterii w badanych mysich modelach IBD, wykazano u chorych myszy Gαi2 istotny wzrost liczby pałeczek Gram-ujemnych, w szczególności *E. coli,* zarówno w tkance, jak i w treści jelitowej. Można więc zakładać, że toczący się proces zapalny był bezpośrednio związany ze wzrostem populacji *E. coli*, musiały zatem wystąpić dodatkowe czynniki, które regulowały tą populację bakterii. W trakcie zaostrzenia się stanu zapalnego jelit, obserwuje się m.in. pojawienie się krwi w treści jelitowej, co może bezpośrednio prowadzić do uwolnienia się znacznej ilości jonów żelaza. W zdrowym organizmie gospodarza stężenia wolnych jonów żelaza są bardzo niskie i wynoszą poniżej 10^{-18} M. Utrzymywanie tak niskiego stężenia tych jonów w przestrzeniach pozakomórkowych jest możliwe dzięki silnemu ich wiązaniu przez białka gospodarza, takie jak transferyna i laktoferyna [7, 13]. Można jednak przypuszczać, że w trakcie przewlekłego stanu zapalnego jelit mechanizmy te zawodzą, w wyniku czego może dochodzić do znacznego, niekontrolowanego uwalniania się dużej liczby cząsteczek hemoglobiny, potem hemu, a następnie jonów żelaza, które są natychmiast wyłapywane przez siderofory produkowane przez *E. coli* [10, 12]. Wzrost stężenia wolnych jonów żelaza, a także innych substancji odżywczych, w tym również zwiększone stężenie tlenu w przewodzie pokarmowym chorych myszy wpływa prawdopodobnie na wzrost populacji tego gatunku bakterii [16]. Tak więc, wzrost populacji pałeczek *E.coli*, a nie ich wyjątkowa wirulencja, może być już wystarczającym czynnikiem regulującym podtrzymywanie procesu zapalnego jelit.

Piśmiennictwo

1. Ahmad T., Tamboli C.P., Jewell D., Colombel J.F.: Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastoenterology*, **126**, 1533–1549 (2004)
2. Asseman C., Mauze S., Leach M.W., Coffman R.L., Powrie.: An essential role fgor interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med*. **190**, 995–1004 (1999)
3. Bancroft J.D., Gamble M.: Theory and practice of histological techniques. Wyd. II. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002
4. Belley A., Keller K., Göttke M., Chadee K.: Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**, suppl. 4, 10–15 (1999)
5. Birnbaumer L., Birnbaumer M.: Signal transduction by G proteins: 1994 edition. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **15**, 213–252 (1995)
6. Blumberg R.S., Strober W.: Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA*, **285**, 643–647 (2001)
7. Crosa J.H.: The relationship of plasmid-mediated iron transport and bacterial virulence. *Annu.Rev. Microbiol.* **38**, 69–89 (1984)
8. Dwarakanath A.D., Campbell B.J., Tsai H.H., Sunderland D., Hart C.A., Rhodes J.M.: Faecal mucinase activity assessed in inflammatory bowel disease using 14C threonine labelled mucin substrate. *Gut*, **37**, 58–62 (1995)
9. Fantini M.C., Monteleone G., Macdonald T.T.: New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis*. **13**, 1419–1423 (2007)
10. Griffiths E.: The iron uptake systems of pathogenic bacteria. (w:) Iron and infection, red. J.J. Bullen, Griffiths, John Willey, Chichester, 1985

11. Kamisago S., Iwamori M., Tai T., Mitamura K., Yazaki Y., Sugano K.: Role of sulfatides in adhesion of Helicobacter pylori to gastric cancer cells. *Infect. Immun*. **64**, 624–628 (1996)
12. Law D., Wilkie K.M., Freeman R., Gould F.K.: The iron uptake mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*: the use of haem and haemoglobin during growth in an iron-limited environment. *J. Med. Microbiol*. **37**, 15–21 (1992)
13. Lawlor K.M., Daskaleros P.A., Robinson R.E., Payne S.M.: Virulence of iron transport mutants of *Shigella flexneri* and utilization of host iron compounds. *Infect. Immun.* **55**, 594–599 (1987)
14. MacDonald T.T., Spencer J.: Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *J. Exp. Med.* **167**, 1341–1349 (1988)
15. Mack D.R., Blain-Nelson P.L., Mauger J.W.: Lack of inhibition of adhesion of an enteropathogenic Escherichia coli by polycarbophil. *J. Biomed. Mater. Res*. **27**, 1579–1583 (1993)
16. Mietzner T.A., Morse S.A.: The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Nutr*. **14**, 471–493 (1994)
17. Mizoguchi A., Mizoguchi E.: Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J. Gastroenterol*. **43**, 1–17 (2008)
18. Mosmann T.R., Sad S.: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today*, **17**, 138–146 (1996)
19. Romagnani S.: The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today*, **18**, 263–266 (1997)
20. Rudolph U., Finegold M.J., Rich S.S., Harriman G.R., Srinivasan Y., Brabet P., Boulay G., Bradley A., Birnbaumer L.: Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nat. Genet*. **10**, 143–150 (1995)
21. Schaedler R.W., Dubos R., Costello R.: Association of germ-free mice with bacteria isolated from normal mice. *J. Exp. Med*. **122**, 77–82 (1965)
22. Tannock G.W.: Normal microbiota of the gastrointestinal tract of rodents. (w) Gastrointestinal microbiology, red. R.I. Mackie, B.A. White, R.E. Isaacson, Chapman and Hall, London, 1997, s. 187–215
23. Tragnone A., Corrao G., Miglio F., Caprilli R., Lanfranchi G.A.: Incidence of inflammatory bowel disease in Italy: a nationwide population-based study. Gruppo Italiano per lo Studio del Colon e del Retto (GISC). *Int. J. Epidemiol*. **25**, 1044–1052 (1996)
24. Twomey D., Ross R.P., Ryan M., Meaney B., Hill C.: Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **66**, 165–185 (2002)
25. Yang H., McElree C., Roth M.P., Shanahan F., Targan S.R., Rotter J.I.: Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut*, **34**, 517–524 (1993)
26. Yolken R.H., Ojeh C., Khatri I.A., Sajjan U., Forstner J.F.: Intestinal mucins inhibit rotavirus replication in an oligosaccharide-dependent manner. *J. Infect. Dis*. **169**, 1002–1006 (1994)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 407–414
http://www.pm.microbiology.pl

NOWE MOŻLIWOŚCI WYKRYWANIA I MONITOROWANIA ZAKAŻEŃ WIRUSOWYCH

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Beata Kasztelewicz[1], Katarzyna Dzierżanowska-Fangrat[1,2]*

[1] Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka
Aleja Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa, tel. (22) 815 71 64
[2] Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów
* Autor korespondencyjny: e-mail: fangrat@supermedia.pl

1. Wprowadzenie. 2. Metody oparte na PCR, real-time PCR. 3. Inne metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych. 3.1. NASBA (nucleic acid sequence-based amplification). 3.2. TMA (transcription-mediated amplification). 4. Metody wykorzystujące wzmocnienie sygnału detekcji. 4.1. Technologia „hybrid capture". 4.2. Branch-chained DNA (bDNA). 5. Trendy w molekularnej diagnostyce zakażeń wirusowych. 6. Podsumowanie

New methods for detection and monitoring of viral infections

Abstract: In recent years a number of molecular diagnostic techniques have been developed for the detection of viral genome, genotyping and measuring of the viral load. The enhanced detection of viruses can be achieved either by amplifying the target nucleic acid (PCR-based methods, NASBA, TMA) or by amplifying the signal (bDNA, hybrid capture). These molecular methods are widely used in routine diagnosis and a number of commercial assays is available, which contributes to the improvement in patient care. Automation and microarrays (DNA chips) hold great promise of improvement in the field of viral diagnostics.

1. Introduction. 2. PCR-based methods, real-time PCR. 3. Other nucleic acid amplification-based techniques. 3.1. NASBA (nucleic acid sequence-based amplification). 3.2. TMA (transcription-mediated amplification). 4. Signal amplification based methods. 4.1 Hybrid capture. 4.2. Branch-chained DNA (bDNA). 5. New trends in molecular diagnosis of viral infections. 6. Summary

Słowa kluczowe: bDNA, hybrid capture, NASBA, real-time PCR, TMA
Key words: bDNA, hybrid capture, NASBA, real-time PCR, TMA

1. Wprowadzenie

Wprowadzenie metod biologii molekularnej zrewolucjonizowało diagnostykę chorób zakaźnych, w tym zakażeń wirusowych. Wraz z pojawieniem się nowych patogennych wirusów oraz postępem w terapii przeciwwirusowej wzrasta potrzeba szybkiej i precyzyjnej diagnostyki wirusologicznej. Techniki oparte na hodowli wirusów są czasochłonne, niosą ze sobą ryzyko zakażenia pracowników laboratorium, poza tym nie wszystkie wirusy mogą się namnażać w hodowlach komórkowych. Testy serologiczne wykrywające swoiste przeciwciała pozwalają na „pośredni" pomiar aktywności zakażenia wirusowego, lecz w dużym stopniu zależą od stanu układu immunologicznego pacjenta. Stąd też, metody oparte na bezpośredniej detekcji wirusowego kwasu nukleinowego niejednokrotnie stanowią „złoty standard" w diagnostyce szerokiego spektrum zakażeń wirusowych, umożliwiając wykrycie wirusów przed wystąpieniem objawów klinicznych zakażenia.

W metodach molekularnych wykorzystuje się amplifikację kwasów nukleinowych lub wzmocnienie sygnału detekcji. Obok reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), metodami z pierwszej grupy powszechnie wykorzystywanymi w diagnostyce wirusologicznej są NASBA i TMA. Poza tym często wykorzystuje się techniki oparte na zwielokrotnieniu sygnału tj. bDNA, czy „hybrid capture". Powyższe metody dostępne są jako komercyjne zestawy diagnostyczne, a część z nich posiada akceptację FDA (Food and Drug Administration). Poza testami komercyjnymi w diagnostyce niektórych, istotnych pod względem klinicznym zakażeń wirusowych, wykorzystuje się również tzw. metody „in-house" (opracowane w konkretnym laboratorium dla jego potrzeb).

Molekularna diagnostyka zakażeń wirusowych sprowadza się do oznaczeń jakościowych, ilościowych, genotypowania (w tym wykrywania mutacji determinujących oporność na leki). Oznaczenie jakościowe pozwala na stwierdzenie obecności lub braku materiału genetycznego wirusa w danym materiale klinicznym i jest markerem zakażenia szczególnie istotnym w sytuacjach, gdy potrzebne jest potwierdzenie zakażenia (np.: wykrycie materiału genetycznego wirusa w płynie mózgowo-rdzeniowym – HSV, CMV, HIV, lub owodniowym – HIV, B19, CMV) lub gdy oznaczenia serologiczne nie dają jednoznacznej odpowiedzi („okno serologiczne", obecność przeciwciał matki u dziecka, pacjent w immunosupresji) [1]. W wielu sytuacjach klinicznych oznaczenia jakościowe są niewystarczające, a priorytetem jest pytanie o poziom wiremii. Ilościowe oznaczenie kwasu nukleinowego wirusa (np. HIV, HBV, HCV, CMV, EBV) często jest wykorzystywane jako wskaźnik prognostyczny przebiegu choroby,

w ocenie rokowania (na podstawie początkowego poziomu RNA/DNA wirusa) oraz służy do monitorowania leczenia przeciwwirusowego. Dodatkowo wagę oznaczeń ilościowych potwierdza fakt, że niektóre wirusy (np.: herpeswirusy) mogą przetrwać w stanie latencji po zakażeniu pierwotnym i w ten sposób odpowiadać za dodatnie wyniki oznaczeń jakościowych u osób zdrowych. Stąd też, oznaczenie ilości materiału genetycznego wirusa jest przydatne w różnicowaniu między zakażeniem aktywnym a latentnym [1, 5, 43]. Genotypowanie (głównie dotyczy wirusów: HCV, HIV, HBV, HPV, HSV) w oparciu o detekcję i identyfikację różnic w genomie różnych szczepów/podtypów wirusa może stanowić marker prognostyczny oraz determinować strategię leczenia przeciwwirusowego [5].

2. Metody oparte na PCR, real-time PCR

Metoda PCR w różnych wariantach jest najczęściej stosowaną techniką biologii molekularnej zarówno w badaniach naukowych, jak i w diagnostyce. Metody oparte na tradycyjnej reakcji PCR są powszechnie wykorzystywane w komercyjnych zestawach przeznaczonych do wykrywania wirusów DNA i RNA (w tym ostatnim przypadku stosuje się RT-PCR, czyli PCR poprzedzoną odwrotną transkrypcją), oznaczenia poziomu wiremii oraz w genotypowaniu (tab. I).

Istotnym postępem w metodach PCR było wprowadzenie technologii real-time PCR, która jako narzędzie diagnostyczne o dużym potencjale, cieszy się coraz większą popularnością. Real-time PCR łączy w sobie tradycyjną reakcję PCR z równoczesną detekcją produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym. Technologia real-time PCR opiera się na wykryciu i pomiarze fluorescencji, która wzrasta proporcjonalnie do ilości produktu PCR. Im wyższa początkowa ilość kopii sekwencji docelowej, tym wcześniej obserwuje się istotny wzrost fluorescencji. Kluczową właściwością technologii real-time PCR jest możliwość monitorowania postępu reakcji w czasie rzeczywistym. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu odpowiednich substratów oraz aparatury. Ogólnie, chemia reakcji real-time PCR opiera się na barwnikach interkalujących lub swoistych sondach znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi.

a. Barwniki interkalujące

SYBRGreen I®, EvaGreen™, BOXTO, LC Green™ działają podobnie jak bromek etydyny, tj. nieswoiście wbudowują się w dwuniciową strukturę DNA i w stanie związanym, po wzbudzeniu światłem lasera/lampy halogenowej emitują fluorescencję. W miarę jak polimeraza wydłuża primery, coraz większa ilość barwnika wiąże się z nowo syntetyzowanymi nićmi DNA, w ten sposób maksymalny poziom fluorescencji osiągany jest na końcu etapu wydłużania. Na etapie denaturacji barwnik jest uwalniany i fluorescencja spada. Poziom fluorescencji rejestrowany w każdym cyklu reakcji na końcu etapu elongacji odzwierciedla ilość powstającego produktu PCR. Zaletami takiego systemu są łatwa walidacja metody oraz niski koszt oznaczenia. Co więcej, w przeciwieństwie do formatu real-time PCR opartego na swoistych sondach, mutacje w obrębie amplifikowanej sekwencji nie wpływają na intensywność sygnału oraz jego ilość. Ma to szczególne znaczenie w przypadku wykrywania wirusów charakteryzujących się wysoką zmiennością genetyczną (RNA wirusy). Z drugiej strony, brak sond swoiście rozpoznających sekwencje docelowe przyczynia się do niższej czułości i swoistości metody. Barwniki interkalujące mogą wiązać się z nieswoistymi produktami PCR, w tym z dimerami primer-primer. Stąd też, w celu weryfikacji swoistości amplifikowanego fragmentu po zakończeniu reakcji PCR wykonuje się analizę krzywej dentaruacji [5, 13, 26, 32, 41].

b. Wykrywanie oraz ilościowa ocena poziomu wirusowego materiału genetycznego z wykorzystaniem swoistych sond

W metodach diagnostycznych najczęściej wykorzystuje się format reakcji real-time oparty na sondach komplementarnych do swoistych sekwencji kwasów nukleinowych. Stosuje się wiele typów sond i każda z nich ma unikatowe właściwości, jednak niezależnie od rodzaju sondy strategia jej działania jest ta sama – zmiany fluorescencji generowane z udziałem sondy muszą odzwierciedlać zmiany w ilości amplifikowanego produktu.

S o n d y h y d r o l i z o w a n e. Większość metod real-time PCR wykrywających wirusowe DNA lub RNA wykorzystuje sondy hydrolizowane, często nazywane sondami typu TaqMan®, które swoiście wiążą się z sekwencją docelową między parą primerów. Są to liniowe oligonukleotydy, na końcach wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym – na końcu 5' tzw. barwnikiem reporterowym (np. FAM lub VIC), oraz tzw. quencherem (barwnikiem wyciszającym) na końcu 3'. W momencie wzbudzenia fluorescencji (światłem lasera lub lampy halogenowej), energia fluorescencji reportera jest absorbowana przez quencher. Transfer energii zachodzi najbardziej efektywnie jedynie na krótkich odległościach (reporter znajduje się w bliskim sąsiedztwie quenchera) i zanika, gdy reporter jest oddalony od quenchera. W trakcie reakcji PCR, gdy polimeraza DNA wydłuża startery, sonda jest degradowana w wyniku aktywności 5'nuklezay polimerazy TaqMan®, w ten sposób barwnik reporterowy i quencher są rozdzielane. Transfer energii fluorescencji reportera do quenchera zanika i sygnał fluorescencji reportera jest rejestrowany przez aparat (na końcu etapu

Tabela I

Przykłady komercyjnych testów molekularnych stosowanych w diagnostyce wirusologicznej

Producent	Test	Technologia	Zastosowanie	Zakres liniowości/uwagi
Roche	AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, v 1.5[1]	RT-PCR	RNA HIV-1 ilościowo	50–750 000 kopii/ml
	COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test[1]	real-time PCR	RNA HIV-1 ilościowo	48–10 000 000 kopii/ml
	COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HBV Test	PCR	DNA HBV ilościowo	54,5–110 000 000 IU/ml
	COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HCV Test	real-time PCR	RNA HCV ilościowo	43–69000 000 IU/ml
	LINEAR ARRAY HCV Genotyping Test	RT-PCR	Genotypowanie HCV	identyfikacja 6 genotypów HCV
	LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test	PCR	Genotypowanie HPV	identyfikacja 37 genotypów HPV
	COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test	PCR	DNA CMV ilościowo	600–100 000 kopii/ml
	LightCycler CMV Quant Kit	real-time PCR	DNA CMV ilościowo	10^3–2×10^7 kopii/ml
	LightCycler EBV Quant Kit	real-time PCR	DNA EBV ilościowo	10^3–2×10^7 kopii/ml
	LightCycler SARS-Co	real-time PCR	RNA SARS ilościowo	10^2–10^6 kopii/ml
	LightCycler HSV1/2 Qual Kit	real-time PCR	DNA HSV jakościowo	detekcja i różnicowanie między HSV-1 i HSV-2
Digene	Hybrid Capture 2 HBV DNA test	hybrid capture	DNA HBV ilościowo	$1{,}42\times10^5$–$1{,}7\times10^9$ kopii/ml
	Hybrid Capture 2 HPV-DNA test[1]	hybrid capture	DNA HPV jakościowo	detekcja i różnicowanie 13 genotypów HPV
bioMérieux	NucliSENS HIV-1 QT	NASBA	RNA HIV-1 ilościowo	176–$3{,}47\times10^6$ kopii/ml
	NucliSENS EasyQ HIV-1	NASBA/real-time	RNA HIV-1 ilościowo	50–3×10^6 IU/ml
Gen-Probe	Versant HCV RNA Qualitative Assay[1]	TMA	RNA HCV jakościowo	
	PROCLEIX HIV-1/HCV[1]	TMA	RNA HIV-1, RNA HCV, jakościowo	
	PROCLEIX ULTRIO[1]	TMA	DNA HBV, RNA HIV-1, RNA HCV, jakościowo	
	PROCLEIX WNV[1]	TMA	RNA WNV jakościowo	
	Abbott Realtime HIV-1[1]	real-time PCR	RNA HIV-1 ilościowo	40–10^7 kopii/ml
	Abbott Realtime HBV	real-time PCR	DNA HBV ilościowo	10–10^9 IU/ml
	Abbott Realtime HCV	real-time PCR	RNA HCV ilościowo	12–10^8 IU/ml
Bayer	Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA)[1]	bDNA	RNA HIV-1 ilościowo	75–500 000 kopii/ml
	Versant HCV RNA 3.0 Assay (bDNA)	bDNA	RNA HCV ilościowo	3200–4×10^7 kopii/ml
Genomica	Clinical Arrays HPV Genotyping	low-density microarray – technologia, ArrayTube	Detekcja 35 genotypów wirusa HPV, jakościowo	

[1] akceptacja FDA

elongacji). W optymalnych warunkach reakcji, istnieje liniowa korelacja między liczbą uwolnionych cząsteczek reportera a ilością syntetyzowanego produktu w każdym cyklu reakcji PCR. Ta zależność stanowi podstawę kalkulacji początkowej liczby kopii sekwencji docelowej. Główną zaletą metody real-time PCR z wykorzystaniem sond hydrolizowanych jest wysoka czułość i swoistość determinowana zarówno przez startery jak i sondę. Niemniej jednak, należy pamiętać, że mutacje punktowe w regionie rozpoznawanym przez sondę mogą negatywnie wpływać na detekcję produktu, w rezultacie możliwe jest uzyskanie wyników fałszywie ujemnych lub zaniżonych, co stanowi potencjalny problem w oznaczeniach wirusów HIV, HCV charakteryzujących się dużą zmiennością genomu [13, 30, 32, 35, 37].

S o n d y h y b r y d y z u j ą c e (HybProbe). W formacie real-time PCR opartym na sondach hybrydyzujących wykorzystuje się dwie sekwencje oligonukleotydowe, które hybrydyzują w bliskim sąsiedztwie w obrębie sekwencji docelowej, między primerami. Jedna z sond na końcu 3' jest wyznakowana barwinkiem donorowym (np. fluoresceiną, emitującą światło zielone), druga sonda na końcu 5' posiada barwnik akceptorowy (np. LC Red 640, emitujący światło czerwone). Sondy są tak zaprojektowane, by hybrydyzowały z tą samą nicią DNA w konfiguracji głowa-ogon, w odległości 1–5 nukleotydów, tak by zapewnić odpowiednią bliskość obu barwników. Barwniki świecą tylko wtedy, gdy znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie. Źródło światła generowane przez aparat pobudza barwnik donorowy (3' zielony), a ten z kolei przekazuje energię fluorescencji na barwnik akceptorowy (5' czerwony). Pomiar czerwonego światła (wzbudzonego przez zielone) zachodzi na końcu etapu przyłączania starterów i sond. Następnie temperatura jest podwyższana (etap wydłużania starterów), sondy odłączają się od sekwencji docelowej, barwniki donorowy i akceptorowy są oddalone i nie dochodzi do emisji czerwonego światła. Ilość fluorescencji światła czerwonego jest proporcjonalna do ilości powstającego produktu i podobnie jak w przypadku sond hydrolizowanych kinetyka fluorescencji pozwala na oszacowanie ilości początkowej kopii sekwencji docelowej. Zaletą sond hybrydyzujących jest to, że nie ulegają degradacji, w ten sposób możliwa jest analiza krzywej dysocjacji (weryfikacja swoistości reakcji). Potencjalną wadą takiego rozwiązania jest konieczność zaprojektowania dwóch odrębnych sond oligonukleotydowych, zdolnych do hybrydyzacji w rejonie między primerami, stąd też w zależności od sekwencji docelowej, może być trudne znalezienie sekwencji o odpowiedniej długości, by w jej obrębie umieścić parę primerów oraz dwie sondy [7, 32, 41].

M o l e c u l a r B e a c o n®. Sonda Molecular Beacon® charakteryzuje się wysoką swoistością, która determinowana jest przez jej strukturę. Sonda posiada barwnik fluorescencyjny na jednym i quencher na drugim końcu. W stanie wolnym sonda Molecular Beacon® przyjmuje strukturę „szpilki do włosów", barwnik reporterowy oraz quencher znajdują się w bliskim sąsiedztwie i quencher wygasza sygnał fluorescencji reportera. Jest to stabilna konformacja i tylko w obecności komplementarnej sekwencji docelowej sonda hybrydyzuje w regionie pętli, co prowadzi do zmiany jej konfiguracji – przyjmuje strukturę liniową. W konsekwencji reporter i quencher są oddalone od siebie i nie dochodzi do wygaszania fluorescencji reportera. Jakiekolwiek zmiany w sekwencji docelowej znacznie redukują skuteczność wiązania się sondy i mogą prowadzić do otrzymania wyników fałszywie ujemnych [7, 13, 41].

N o w e t y p y s o n d. Sondy PNA (zbudowane z syntetycznego analogu DNA – kwasu peptydonukleinowego, peptide-nucleic acid) oraz sondy i primery LNA (locked nucleic acid, zmodyfikowane oligonukleotydy zawierające bicykliczną rybozę) charakteryzują się wysoką stabilnością i zwiększoną swoistością wiązania do komplementarnej sekwencji DNA. Dzięki modyfikacjom oligonukleotydu różnica w temperaturze topnienia sondy komplementarnej i częściowo komplementarnej jest wyraźna i pozwala na precyzyjne różnicowanie między docelowymi sekwencjami całkowicie i częściowo komplementarnymi, co ma istotne znaczenie w oznaczeniach jakościowych i ilościowych różnych serotypów lub szczepów wirusa, które mogą różnić się jednym nukleotydem w regionie amplifikowanym [20, 32, 41].

Technika real-time PCR znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce zakażeń wirusowych, niejednokrotnie stając się atrakcyjną alternatywą dla metod opartych na standardowej reakcji PCR. Poza możliwością wykrywania pojedynczych wirusów, technologia real-time PCR w wariancie multipleks, dzięki zastosowaniu swoistych sond wyznakowanych różnymi barwnikami fluorescencyjnymi, pozwala na równoczesną detekcję kilku różnych szczepów lub rodzajów wirusów. Multipleks real-time PCR powszechnie stosowany jest m.in. w wykrywaniu wirusów zapalenia wątroby HBV i HCV, wirusów grypy (A i B), wirusów paragrypy (PIV 1-4) [41]. Technologia real-time PCR obok identyfikacji czynnika zakaźnego, typowania (m.in. wirusów grypy, HCV, HPV) i detekcji mutacji determinujących oporność na leki, stosowana jest w oznaczeniach ilościowych. Komercyjne zestawy do ilościowej oceny poziomu wirusa są dostępne dla ograniczonej liczby patogenów (w tym m.in. HBV, HCV, HIV, CMV, EBV, SARS) (tab. I).

Dla pozostałych istotnych z punktu widzenia klinicznego wirusów opracowano wiele metod „in-house", które charakteryzuje bardzo wysoka czułość, z limitem detekcji 1–10 kopii sekwencji docelowej oraz szeroki zakres dynamiki pomiaru (ponad 7 log) [7, 29, 41].

W porównaniu do metod opartych na standardowej reakcji PCR, real-time PCR charakteryzuje się lepszą czułością, większym zakresem liniowości, przy zredukowanym ryzyku kontaminacji [5, 18, 19, 23, 28–30, 37, 44, 46]. Technologia real-time PCR jest metodą nowoczesną, stosunkową tanią (jeśli nie liczyć kosztów zakupu aparatury) i co ważniejsze, o dużym potencjale diagnostycznym, niemniej wymaga dalszych badań zmierzających do jej normalizacji i standaryzacji (szczególnie dotyczy to oznaczeń ilościowych).

3. Inne metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych

3.1. NASBA (nucleic acid sequence-based amplification)

NASBA jest izotermiczną reakcją amplifikacji sekwencji RNA. Zasada metody przypomina strategię replikacji retrowirusów. NASBA wykorzystuje 3 enzymy (AMV RT, RNazę H oraz polimerazę RNA faga T7) oraz dwa startery i pozwala na uzyskanie 10^8 kopii RNA w czasie zaledwie 30 minut [9]. W początkowym etapie NASBA, primer 1 zawierający sekwencję promotora dla polimerazy RNA faga T7 przyłącza się do komplementarnej sekwencji docelowego RNA. Enzym odwrotna transkryptaza (AMV RT) syntetyzuje cDNA poprzez wydłużenie primera 1 i w rezultacie powstaje hybryda RNA:cDNA. Następnie RNaza H degraduje pierwotny RNA. Primer 2 przyłącza się do cDNA i odwrotna transkryptaza (która posiada również aktywność polimerazy DNA zależnej od DNA) syntetyzuje komplementarną nić DNA poprzez wydłużanie primera 2. Polimeraza RNA faga T7 wiąże się z sekwencją promotora i syntetyzuje nić RNA. Nowo powstała nić RNA jest komplementarna do wyjściowej (matrycowej) nici RNA. W kolejnych etapach syntetyzowane jest cDNA, następnie potomne nici RNA, które z kolei służą jako matryca do syntezy nowych RNA.

Amplifikacja NASBA może być przeprowadzona w wariancie multipleks, w oznaczeniach więcej niż jednej sekwencji docelowej lub z uwzględnieniem kontroli wewnętrznej umożliwiającej monitorowanie przebiegu oznaczenia od momentu ekstrakcji kwasów nukleinowych po detekcję swoistego produktu. Metoda NASBA została zaadaptowana zarówno do oznaczeń jakościowych, jak i ilościowych. W wykrywaniu produktu końcowego wykorzystuje się układ ECL (detekcja w oparciu o elektrochemiluminescencję przy zastosowaniu cząstek magnetycznych opłaszczonych streptawidyną oraz sond znakowanych rutenem), a od niedawna również technologię real-time z zastosowaniem sond typu Molecular Bacon [5, 10, 14]. Połączenie tradycyjnej techniki NASBA z detekcją produktu w formacie real-time przyczyniło się do redukcji ryzyka kontaminacji [30, 45].

NASBA stanowi alternatywę dla metod PCR, charakteryzuje się podobną szybkością i czułością. W przeciwieństwie do RT-PCR (która wymaga oczyszczonego RNA, wolnego od DNA) technika ta pozwala na selektywną amplifikację RNA nawet przy dużej zawartości DNA. Dodatkowo jest to reakcja izotermiczna, jej warunki są względnie stałe i standardowe dla wszystkich aplikacji, stąd też w porównaniu do PCR optymalizacja metody jest prostsza.

Na rynku dostępnych jest kilka zestawów firmy bioMerieux, wykorzystujących technologię NASBA, w tym do oznaczenia wiremii HIV (NucliSENS EasyQ HIV 1 v 1.2), ilościowego oznaczenia replikacji wirusa CMV (NucliSENS CMV pp67), diagnostyki zakażeń dolnych dróg oddechowych (NucliSENS EasyQ RSV A+B) oraz diagnostyki zakażeń centralnego układu nerwowego (NucliSENS EasyQ Enterovirus, NucliSENS EasyQ HSV 1/2).

3.2. TMA (transcription-mediated amplification)

TMA jest izotermiczną amplifikacją RNA. Zasada metody jest podobna do NASBA, z tym, że zamiast trzech enzymów wykorzystuje się dwa – odwrotną transkryptazę i polimerazę RNA faga T7. Odwrotna transkryptaza tworzy dwuniciowy DNA, który jest wykorzystywany przez polimerazę RNA do syntezy pojedynczych nici RNA W wyniku amplifikacji TMA powstaje do 10 bilionów kopii RNA w ciągu 15–30 minut [10, 17]. TMA i NASBA różnią się także sposobem detekcji produktu. Produkt TMA jest wykrywany w oparciu o tzw. test hybrydyzacyjnej protekcji HPA (hybrydization protection assay). HPA wykorzystuje sondy DNA znakowane estrem akrydyny. Dodanie odczynnika lizującego estry akrydyny pozwala na rozróżnienie między sondą związaną i niezwiązaną z docelowym RNA. W sytuacji, gdy nie powstaje swoisty produkt amplifikacji i sonda nie hybrydyzuje, dochodzi do hydrolizy estru akrydyny, natomiast tworzenie dupleksu sonda:RNA „chroni" estry akrydyny przed hydrolizą. Dodanie kolejnych odczynników wywołuje chemiluminescencję pochodzącą od związanych sond. Sygnał chemiluminescencji jest mierzony przez detektor luminescencji i wyrażany w jednostkach RLU (relative light unit) [11].

Metodę TMA wykorzystuje się głównie w oznaczeniach jakościowych. Firma Gen-Probe zastosowała technologię TMA w zestawach przeznaczonych do wykrywania materiału genetycznego najważniejszych wirusów przenoszonych drogą krwi zarówno w pojedynczych donacjach, jak i w puli osocza. PROCLEIX HIV-1/HCV oraz PROCLEIX ULTRIO służą do równoczesnej detekcji materiału genetycznego, odpowiednio

wirusów HCV i HIV-1 oraz HCV, HBV i HIV-1. Są to testy powszechnie wykorzystywane w krwiodawstwie w USA i Europie (w Polsce od 2003 roku, [2]). Ostatnio firma wprowadziła na rynek kolejny test oparty na TMA do detekcji materiału genetycznego wirusa Zachodniego Nilu (PROCLEIX WNV).

TMA jest metodą czulszą od RT-PCR [4, 15, 21, 31] i bDNA [6]. Dodatkowo, przeprowadzanie izolacji, oczyszczania i amplifikacji w pojedynczej probówce redukuje ryzyko kontaminacji.

4. Metody wykorzystujące wzmocnienie sygnału detekcji

4.1. Technologia „hybrid capture"

Test hybrydyzacji pozwala na detekcję kwasów nukleinowych o komplementarnych sekwencjach (są lub ich nie ma), umożliwia również ilościowe oznaczenie swoistego DNA lub RNA. W tym celu wykorzystuje się wyznakowane jednoniciowe fragmenty kwasu nukleinowego o dokładnie znanej sekwencji nukleotydów komplementarnych do sekwencji występującej w kwasie nukleinowym, który jest wykrywany lub oceniany ilościowo. Możliwe są różne rozwiązania techniczne. W celu zwiększenia czułości technik hybrydyzacji opracowano metody wzmocnienia sygnału generowanego przez sondę po jej związaniu się z komplementarną sekwencją docelowego kwasu nukleinowego. Teoretycznie wzmocnienie sygnału detekcji jest możliwe do osiągnięcia m.in. poprzez przyłączenie do sondy dużej ilości znacznika. Metody te w przeciwieństwie do technik amplifikacji kwasów nukleinowych, są w mniejszym stopniu podatne na kontaminację. Z drugiej strony czułość metod opartych na wzmocnieniu sygnału detekcji jest niższa od czułości enzymatycznych metod amplifikacji kwasów nukleinowych [25].

Opracowana przez firmę Digene technologia „hybrid capture" wykorzystuje hybrydyzację zdenaturowanego DNA wirusa z komplementarną sondą RNA. Swoiste przeciwciała unieruchomione na mikropłytce wiążą powstałe hybrydy DNA:RNA. Następnie z unieruchomionymi hybrydami wiążą się inne przeciwciała skoniugowane z fosfatazą alkaliczną (AP). Do pojedynczej hybrydy DNA:RNA przyłącza się kilka przeciwciał skoniugowanych z wieloma cząsteczkami AP, w ten sposób osiąga się zwielokrotnienie sygnału chemiluminescencji generowanego w wyniku rozkładu przez enzym AP substratu chemiluminescencyjnego [31]. „Hybrid capture" zastosowano w komercyjnych zestawach przeznaczonych do diagnostyki zakażeń wirusami HBV, HPV i CMV firmy Digene. „Hybrid capture" charakteryzuje się wyższą czułością od metod hodowlanych oraz oznaczeń serologicznych, niemniej jednak jest mniej czuły w porównaniu z PCR i innymi metodami amplifikacji kwasów nukleinowych [12, 25, 39].

4.2. Branch-chained DNA (bDNA)

W porównaniu do ilościowych metod amplifikacji kwasów nukleinowych, bDNA wykazuje lepszą powtarzalność, jest metodą mniej pracochłonną, nie wymaga rozcieńczania próbki, niemniej jednak jest mniej czuła [3, 4, 14]. Dostępne są komercyjne zestawy do ilościowych oznaczeń HBV, HCV, HIV (Quantiplex™ Bayer Diagnostics). W technologii bDNA stosuje się diwalentną sondę, która swoiście wiąże się z wirusowym RNA lub DNA i unieruchamia go na mikropłytce. Inna diwalentna sonda wiąże opłaszczoną docelową sekwencję z syntetyczną wielokrotnie rozgałęzioną cząsteczką DNA (bDNA, tzw. amplifier). Następnie w nadmiarze dodawana jest sonda skoniugowana z enzymem, która wiąże się do wielu miejsc w obrębie bDNA. Po etapie płukania dodaje się substrat chemiluminescencyjny (dioxetane) i generowany jest sygnał chemiluminescencyjny. Jego natężenie jest proporcjonalne do ilości wirusowego kwasu nukleinowego. Ilość wirusowego kwasu nukleinowego w badanej próbce jest określana na podstawie krzywej standardowej generowanej z analizowanych standardów o znanej ilości kopii i wyrażana w kopiach na mililitr. bDNA pozwala na nawet 3000-krotne zwiększenie sygnału detekcji [24].

Metoda bDNA została zaadaptowana w diagnostyce zakażeń wirusami charakteryzującymi się dużą zmiennością genomu (HCV, HIV) – pozwala na równoczesną detekcję wielu różnych sekwencji docelowego kwasu nukleinowego poprzez zastosowanie różnorodnych sond.

VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) firmy Bayer pozwala na ilościowe oznaczenie HIV-1 RNA w osoczu w zakresie 75–500000 kopii/ml. Zastosowanie ponad 80 różnych sond swoistych dla konserwatywnych sekwencji wirusowego genomu (regionu pol) pozwala na wykrywanie i ilościowe oznaczenie wszystkich głównych podtypów wirusa HIV-1. VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) jest wykorzystywany w monitorowaniu skuteczności leczenia przeciwwirusowego oraz ocenie progresji zakażenia. Nie jest zalecany w badaniach przesiewowych w kierunku HIV oraz jako test potwierdzenia zakażenia HIV. Inny zestaw – VERSANT® HCV RNA 3.0 Assay (bDNA) Bayer pozwala na pomiar liczby kopii wszystkich 6 genotypów wirusa HCV w szerokim zakresie liniowości (3 200–40 000 000 kopii/ml). W porównaniu do testu COBAS Amplicor HCV Monitor v.2.0, bDNA v 3.0 charakteryzuje się lepszą powtarzalnością i większym zakresem liniowości [22].

5. Trendy w molekularnej diagnostyce zakażeń wirusowych

Wraz z dążeniami, by nowe testy molekularne były coraz szybsze, prostsze w wykonaniu oraz bardziej precyzyjne, a przez to wiarygodne, pojawiła się tendencja do automatyzacji oznaczeń, w tym najbardziej pracochłonnego etapu – procesu izolacji i oczyszczania kwasów nukleinowych. Na rynku dostępnych jest kilka systemów automatycznych (BioRobot MDX, Qiagen; MagNA Pure LC, Roche Applied Science; ABI Prism 6700, Applied Biosystems; NucliSens Extractor, bioMèrieux), które w krótkim czasie umożliwiają przeprowadzanie wielu izolacji z szerokiego spektrum materiałów klinicznych. W porównaniu do metod manualnych, systemy automatyczne charakteryzuje wysoka niezawodność, wydajność, powtarzalność wyników i zredukowane ryzyko kontaminacji [7, 37, 41, 42]. Niewątpliwie wadą systemów automatycznych jest ich wysoka cena, stąd też instalowane są głównie w laboratoriach wykonujących duże liczby oznaczeń.

Technologią przyszłości mogą okazać się mikromacierze, czyli chipy DNA, zawierające dużą liczbę różnych sekwencji oligonukleotydowych (sond DNA), umieszczonych w określonych miejscach na powierzchni płytki, co pozwala na równoczesne przeprowadzenie, w krótkim czasie, kilku eksperymentów hybrydyzacyjnych. Aktualnie trwają badania nad przystosowaniem techniki mikromacierzy do celów diagnostycznych. W literaturze można znaleźć wiele doniesień dotyczących praktycznych zastosowań mikromacierzy w szeroko rozumianej diagnostyce chorób wirusowych [8, 9, 16, 27, 33, 36, 40, 47]. Mikromacierze zastosowano nie tylko do detekcji i identyfikacji wirusów, ale również w badaniach nad mechanizmami chorób, w tym aktywności transkrypcyjnej genów gospodarza i genów wirusowych (np. w zakażeniu aktywnym i latentnym), w identyfikacji markerów pozwalających na ocenę ryzyka rozwoju zakażenia, do określenia miejsc docelowego działania nowych leków. Potencjalnie, dzięki mikromacierzom możliwe będzie pełniejsze rozpoznanie i dostosowanie leczenia do indywidualnego przypadku pacjenta. Przeszkodą na drodze do wprowadzania mikromacierzy do rutynowej diagnostyki, poza wysokim kosztem, są trudności w standaryzacji i optymalizacji tego wysoce złożonego narzędzia.

6. Podsumowanie

Metody biologii molekularnej niejednokrotnie stanowią złoty standard w diagnostyce szerokiego spektrum zakażeń wirusowych. Na potrzeby diagnostyki zaadaptowano wiele technik, które w różnym stopniu zautomatyzowane, pozwalają na uzyskanie wiarygodnego wyniku w coraz krótszym czasie. W ostatnich latach szczególnego znaczenia nabrała metoda real-time PCR, która jest narzędziem o bardzo wysokiej czułości. Trwają intensywne badania mające na celu standaryzację oznaczeń ilościowych. Nadzieją na przyszłość jest technologia mikromacierzy, która pozwoli być może na wielokierunkową diagnostykę zakażeń uwzględniającą czynniki prognostyczne przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie.

Piśmiennictwo

1. Berger A., Preiser W.: Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 713–721 (2002)
2. Brojer E.: Badania serologicznych i molekularnych markerów HCV u dawców krwi w Polsce. *Przegl. Epidemiol.* **59**. 511–517 (2005)
3. Caliendo A.M., Ingersoll J., Fox-Canale A.M., Pargman S., Bythwood T., Hayden M.K., Bremer J.W., Lura N.S.: Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1726–1732 (2006)
4. Desombere I., Van Vlierberghe H., Couvent S., Clinckspoor F., Leroux-Roels G.: Comparison of qualitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus VERSANT HCV RNA) and quantitative (COBAS AMPLICOR HCV Monitor 2.0 versus VERSANT HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2590–2597 (2005)
5. Domiati-Saad R., Scheuermann R.H.: Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clin. Chim. Acta*, **363**, 197–205 (2006)
6. Emery S., Overbaugh J. i wsp.: Evaluation of performance of the Gen-Probe human immunodeficiency virus type 1 viral load assay using primary subtype A, C, and D isolates from Kenya. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2688–2695 (2000) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
7. Espy M.J., Smith T.F. i wsp.: Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 165–256 (2006) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
8. Fan J., Kraft A.J., Henrickson K.J.: Current methods for the rapid diagnosis of biotherrorism-related infectious agents. *Pediatr. Clin. N. Am.* **53**, 817–842 (2006)
9. Fawley W.N., Wilcox M.H.: Molecular diagnostic techniques. *Medicine*, **33**, 26–32 (2005)
10. Ginocchio C.C.: Life beyond PCR: alternative target amplification technologies for the diagnosis of infectious diseases, part I. *Clin. Microbiol. News*, **26**, 121–128 (2004)
11. Ginocchio C.C.: Life beyond PCR: alternative target amplification technologies for the diagnosis of infectious diseases, part II. *Clin. Microbiol. News*, **26**, 129–136 (2004)
12. Gish R.G., Locarnini S.A.: Chronic hepatitis B: current testing strategies. *Clin. Gast. Hepat.* **4**, 666–676 (2006)
13. Gunson R.N., Collins T.C., Carman W.F.: Practical experience of high throughput real-time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J. Clin. Virol.* **35**, 355–367 (2006)
14. Hodinka R.L.: The clinical utility of viral quantification using molecular methods. *Clin. Diagn. Virol.* **10**, 25–47 (1998)

15. Hofmann W., Dries V., Herrmann E., Gärtner B., Zeuzem S., Sarrazin C.: Comparison of transcription mediated amplification (TMA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *J. Clin. Virol.* **32**, 289–293 (2005)
16. Honma S., Hoshino Y. i wsp.: Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2641–2648 (2007) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
17. Jungkind D.: Molecular testing for infectious disease. *Science*, **294**, 1553–1555 (2001)
18. Klein D.: Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med.* **8**, 257–260 (2002)
19. Laperche S., Lefrère J-J. i wsp.: Expertise of laboratories in viral load quantification, genotyping, and precore mutant determination for hepatitis B virus in a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3600–3607 (2006) (cytowana praca jest dziełem 18 autorów)
20. Morandi L., Ferrari D., Lombardo C., Session A., Tallini G.: Monitoring HCV RNA viral load by locked nucleic acid molecular beacons real time PCR. *J. Viral. Methods*, **140**, 148–154 (2007)
21. Morihima C., Gretch D. i wsp.: HCV RNA detection by TMA during the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis (Halt-C trial). *Hepatology*, **44**, 360–367 (2006) (cytowana praca jest dziełem 14 autorów)
22. Morishima C., Chung M., Ng K.W., Brambilla D.J., Gretch D.R.: Strengths and limitations of commercial tests for hepatitis C virus RNA quantification. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 421–425 (2004)
23. Perrin L., Pawlotsky J.M., Bouvier-Alias M., Sarrazin C., Zeuzem S., Colucci G.: Multicenter performance evaluation of a new TaqMan PCR assay for monitoring human immunodeficiency virus RNA load. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4371–4375 (2006)
24. Persing D.H.: In vitro nucleic acid amplification techniques (w:) Molecular microbiology. Principles and applications. red. D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, T.J. White, Diagnostic, ASM, Washington D.C., 1993, s 61–78
25. Pfaller M.A.: Molecular approaches to diagnosing and managing diseases: practicality and costs. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 312–318 (2001)
26. Ponchel F.: Real-time PCR using SYBR® Green (w:) Real-time PCR. red. M.T. Dorak, Taylor&Francis Group, New York, 2006, s. 139–154
27. Quan P.L., Briese T., Palacios G., Lipkin W.I.: Rapid sequence-based diagnosis of viral infection. *Antiviral Res.* **79**, 1–5 (2008)
28. Ratcliff R.M., Chang G., Tuck-Weng K., Theo P.S.: Molecular diagnosis of medical viruses. *Curr. Issues Mol. Biol.* **9**, 87–102 (2007)
29. Sarrazin C., Gärtner B.C., Sizmann D., Babiel R., Mihm U., Hofmann W.P., von Wagner M., Zeuzem S.: Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 729–737 (2006)
30. Schutten M., Peters D., Back N.K.T., Beld M., Beuselinck K., Foulongne V., Geretti A.M., Pandiani L., Tiemann C., Niesters H.G.M.: Multicenter evaluation of the new Abbott real-time assays for quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1712–1717 (2007)
31. Schweitzer B., Kingsmore S.: Combining nucleic acid amplification and detection. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 21–27 (2001)
32. Shipley G.L.: An introduction to real-time PCR (w:) Real-time PCR red. M.T. Dorak, Taylor & Francis Group, New York, 2006, s. 1–29
33. Slobedman B., Cheung A.K.: Microarrays for the study of viral gene expression during human cytomegalovirus latent infection. *Methods Mol. Med.* **141**, 153–175 (2008)
34. Smith T.F., Uhl J., Espy M., Sloan L., Vetter E., Jones M., Rosenblatt J., Cockerill F.R.: Development, implementation, and trend analysis of real-time PCR tests for the clinical microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. News*, **26**, 145–153 (2004)
35. Swanson P., de Mendoza C., Joshi Y., Golden A., Hodinka R.L., Soriano V., S.G. Devare, Hackett J.: Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1. 5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3860–3868 (2005)
36. Szczepura A., Wastmoreland D., Vinogradova Y., Fox J., Clark M.: Evaluation of molecular techniques in prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in immunocompromised patients. *Health Technol. Assess.* **10**, 19–39 (2006)
37. Tang N., Abravaya K. i wsp.: A real-time HIV-1 viral load assay for automated quantification of HIV-1 RNA in genetically diverse group M subtypes A-H, group O and N samples. *J. Virol. Methods*, **146**, 236–245 (2007) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
38. Thibault V., Pichoud C., Mullen C., Rhoads J., Smith J.B., Bitbol A., Thamm S., Zoulim F.: Characterization of a new sensitive PCR assay for quantification of viral DNA isoalted from patients with hepatitis B virus infections. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3948–3953 (2007)
39. Wahlström C., Iftner T., Dillner J., Dillner L.: Population-based study of screening test performance indices of three human papillomavirus DNA tests. *J. Med. Virol.* **79**, 1169–1175 (2007)
40. Wang D., Coscoy L., Zylberberg M., Avila P.C, Boushey H.A., Ganem D., DeRisi J.L.: Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **24**, 15687–15692 (2002)
41. Watzinger F., Ebner K., Lion T.: Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol. Aspects Med.* **27**, 254–298 (2006)
42. Weber B., Berger A.: Molecular detection of hepatitis B virus: recent developments. *J. Lab. Med.* **29**, 33–43 (2005)
43. Whiley D.M., Sloots T.P.: Clinical virology (w:) Real-time PCR red. M.T. Dorak, Taylor&Francis Group, New York, 2006, s. 231–244
44. Yang S., Rothman R.E.: PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 337–348 (2004)
45. Yao J., Liu Z., Ko L.-S., Pan G., Jiang Y.: Quantitative detection of HIV-1 RNA using NucliSnes EasyQ HIV-1 assay. *J. Virol. Methods*, **129**, 40–46 (2005)
46. Yerly S., Perrin L., Van Delden C., Schaffer S., Thamm S., Wunderli W., Kaiser L.: Cytomegalovirus quantification in plasma by an automated real-time PCR assay. *J. Clin. Virol.* **38**, 298–303 (2007)
47. Zheng Z.B., Wu Y.D., Yu X.L., Shang S.Q.: DNA microarray technology for simultaneous detection and species identification of seven human herpes viruses. *J. Med. Virol.* **80**, 1042–1050 (2008)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 415–422
http://www.pm.microbiology.pl

SYSTEMY MDR – ISTOTNY MECHANIZM OPORNOŚCI PAŁECZEK GRAM-UJEMNYCH NA ANTYBIOTYKI I CHEMIOTERAPEUTYKI

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Agnieszka Ewa Laudy

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa, tel. (22) 628 08 22, e-mail: alaudy@wp.pl

1. Wprowadzenie. 2. Klasyfikacja i budowa pomp MDR. 3. Zakres substratowy pomp MDR. 4. Geny kodujące białka pomp i ich ekspresja. 5. Podsumowanie

MDR efflux pumps – the mechanism of Gram-negative rods resistance to antibiotics

Abstract: The most common cause of multidrug resistant strains is the presence of efflux pumps i.e. special transport systems of antibiotics through the cell membrane. The presence of such efflux systems has been described for the majority of the main pathogens belonging to *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Serratia* spp.) as well as to the non-fermentative Gram-negative rods (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*). There are five different families of efflux pumps: ABC, RND, MFS, SMR and MATE. The range of substrates for MDR systems depends on the pump and bacterial species. MDR efflux pumps contribute to the inherent drug resistance of many Gram-negative rods. The most important role in resistance to antibiotics plays the RND-type efflux pumps. These three-component systems extrude various antibiotics (like quinolones, tetracycline, chloramphenicol, macrolides, aminoglycosides and some β-lactams), disinfectants, dyes and detergents. The genes encoding RND efflux pumps are organized in an operon that is under the control of local and global regulatory genes. The most importantclinical problem is the presence of "efflux mutants" with the constitutive overexpression of RND pump genes.

1. Introduction. 2. Classes and structure of MDR efflux pumps. 3. Substrate range for MDR pumps. 4. Genes encoding efflux pumps and their expression. 5. Summary

Słowa kluczowe: systemy pomp MDR, *E. coli*, *P. aeruginosa*
Key words: MDR efflux pumps, *E. coli*, *P. aeruginosa*

1. Wprowadzenie

Pałeczki Gram-ujemne są to bakterie powszechnie występujące w naszym środowisku – bytują w glebie, w środowiskach wodnych (w tym w ściekach), na roślinach oraz u zwierząt. Niektóre z nich stanowią naturalną mikroflorę człowieka. Większość poznanych dotychczas pałeczek Gram-ujemnych to bakterie oportunistyczne, które wywołują zakażenia głównie u osób z obniżoną odpornością. Zasadniczo, bakterie Gram-ujemne w porównaniu do bakterii Gram-dodatnich charakteryzują się mniejszą wrażliwością na większość stosowanych antybiotyków, chemioterapeutyków i środków dezynfekcyjnych. Wynika to przede wszystkim z bardziej złożonej budowy osłon komórkowych. U pałeczek Gram-ujemnych występuje dodatkowo błona zewnętrzna (OM – outer membrane), która stanowi naturalną barierę chroniącą komórkę przed działaniem szkodliwych czynników środowiskowych, a jednocześnie utrudniającą wnikanie związków przeciwbakteryjnych do wnętrza komórek. Ponadto u pałeczek Gram-ujemnych występują w osłonach komórkowych systemy pomp MDR (multi-drug resistance), które aktywnie usuwają na zewnątrz komórek substancje szkodliwe dla bakterii, w tym antybiotyki, chemioterapeutyki i środki dezynfekcyjne. W odróżnieniu od pomp obecnych u bakterii Gram-dodatnich, substratami dla systemów MDR u pałeczek są nie tylko związki o zbliżonej budowie, ale także kilka grup substancji znacznie różniących się między sobą. Systemy pomp MDR są jednym z podstawowych i powszechnie występujących mechanizmów oporności pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz *Pseudomonas* spp. na związki przeciwbakteryjne. Prawdopodobnie pompy MDR były obecne u bakterii jeszcze przed wprowadzeniem do lecznictwa pierwszych antybiotyków i pełniły naturalną fizjologiczną rolę w usuwaniu substancji szkodliwych. Wykazano obecność pomp MDR u szczepów *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* serovar Typhimurium tworzących mikroflorę jelit ssaków oraz ptaków. Pompy te warunkują wrodzoną oporność pałeczek na żółć i sole żółciowe, które są naturalnymi substancjami przeciwbakteryjnymi występującymi w świetle jelit. Ponadto pompy MDR pełnią fizjologiczną rolę w sekrecji wewnątrzkomórkowych metabolitów oraz białek. Wprowadzenie do powszechnego użycia antybiotyków pozwoliło nie tylko na rozwiązanie problemu leczenia zakażeń bakteryjnych, ale jednocześnie spowodowało rozwój mechanizmów oporności bakterii na te związki. Większość opisanych dotychczas pomp MDR ma charakter indukcyjny, a w zakres substratowy pomp pałeczek

Gram-ujemnych wchodzi szereg różnych grup antybiotyków. Wykazano, że niektóre z antybiotyków silnie indukują ekspresję operonów kodujących białka tworzące pompy, a długotrwałe ich stosowanie może prowadzić do mutacji w obrębie systemów kontrolujących geny „pomp MDR". W ostatnich 10-latach opisano występowanie wśród izolatów klinicznych *P. aeruginosa* oraz bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, szczepów MDR, u których przyczyną wielolekooporności była nadekspresja operonów kodujących systemy pomp.

2. Klasyfikacja i budowa pomp MDR

Wyróżniamy 5 klas (zwanych rodzinami lub superrodzinami) pomp MDR [23]:

- ABC (ATP-binding cassette family),
- RND (resistance-nodulation-division family),
- MFS (major facilitator superfamily),
- SMR (small multidrug resistance family),
- MATE (multidrug and toxic compound extrusion family).

Różnego rodzaju substancje są usuwane na zewnątrz komórki bakteryjnej przy udziale ww. systemów na drodze aktywnego transportu. Spośród wymienionych klas jedynie pompy z rodziny ABC pobierają energię z rozpadu ATP. Pozostałe klasy pomp to pompy protonowe. Ponadto pompy rodziny MATE mogą także wykorzystywać różnicę w gradiencie stężeń jonów sodowych.

Największe znaczenie w oporności, zarówno szczepów środowiskowych jak i klinicznych pałeczek Gram-ujemnych na szereg antybiotyków z różnych grup mają systemy pomp RND (nazywane RND-MEF-OMP efflux systems) [23]. Składają się one z trzech grup białek:

- białek RND (resistance-nodulation-division protein) – transporter w błonie cytoplazmatycznej,
- białek OMF (outer-membrane factor), należące do grupy białek OMP (outer-membrane protein) – pełnią funkcje kanału w błonie zewnętrznej,
- białek MFP (periplasmic membrane fusion protein) – tworzą kanał łączący transporter RND z białkami OMF.

W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad ustaleniem krystalograficznych struktur białek tworzących systemy RND oraz badania genetyczne, które wspólnie mogą doprowadzić do wyjaśnienia mechanizmów funkcjonowania tych pomp. Najbardziej zaawansowane są obecnie badania dotyczące dwóch systemów pomp, tj. AcrAB-TolC (występuje u *E. coli*) i MexAB-OprM (u *P. aeruginosa*) [4, 11, 32]. Wykazano, że za zakres substratowy systemu pomp odpowiada cytoplazmatyczny transporter RND, który składa się z trzech monomerów. W każdym takim białkowym monomerze wyróżniamy 12 „α helis" (przenikają błonę cytoplazmatyczną na całej jej grubości) oraz charakterystyczne dwie duże pętle uformowane pomiędzy określonymi łańcuchami aminokwasowymi (helisami) tych białek (położone są w przestrzeni peryplazmatycznej). Miejsce aktywne (central cavity), do którego przyłączają się określone substraty, to duża przestrzeń we wnętrzu pompy RND położona na wysokości błony cytoplazmatycznej i przechodząca do części peryplazmatycznej. Dotarcie substratów do miejsca aktywnego ułatwiają struktury zwane przedsionkami (vestibules). W pompie AcrB miejsce aktywne otoczone jest przez trzy takie przedsionki, co warunkuje jednoczesne przyłączanie się trzech cząsteczek substratów. Związanie się substratów z miejscem aktywnym prawdopodobnie powoduje otwarcie wąskiego łącznika (pore), poprzez który związki transportowane są do peryplazmatycznego kanału (funnel) pompy RND, w kierunku białek OMF. Badania krystalograficzne białek AcrB i TolC wykazały, że górne części peryplazmatycznych domen pompy AcrB bezpośrednio stykają się z białkami formującymi kanał TolC. Natomiast białka MFP scalają konstrukcję systemów pomp RND.

O wiele bardziej złożony jest mechanizm działania oraz budowa systemów pomp RND, w których kompleks RND-MFP łączy się z różnymi kanałami OMF w zależności od aktywnie usuwanych substratów. Przykładem takich systemów jest MexJK-OprM/OpmH występujący u *P. aeruginosa*. Prawdopodobnie w systemach tych transporter RND połączony jest bezpośrednio jedynie z białkami MFP, które tworzą zamknięty kanał. W przypadku obecności substratu jednostka RND-MFP łączy się z odpowiednim transporterem OMF, co powoduje otwarcie kanału utworzonego przez białka MFP. Być może, taki model funkcjonowania dotyczy wszystkich pomp z grupy Mex. Badano mutanty posiadające systemy MexEF-OprN lub MexCD-OprJ z uszkodzonym odpowiednio genem *oprN* lub *oprJ*. Wykazano, że podjednostki pomp MexEF i MexCD mogą łączyć się z białkiem OprM tworząc system pomp o niezmienionej funkcji [15, 23].

Systemy pomp RND mają zdolność aktywnego usuwania szerokiej gamy różnych związków bezpośrednio na zewnątrz komórek bakteryjnych. Ich substratami są zarówno substancje, których obecność wykazano w cytozolu komórek, jak i związki, które ze względu na swoją budowę przenikają poprzez błonę plazmatyczną jedynie do przestrzeni peryplazmatycznej. Obecnie uważa się, że substraty mogą być aktywnie usuwane przez systemy RND w dwojaki sposób [23, 32]. W przypadku związków, występujących w przestrzeni peryplazmatycznej, dochodzi w pierwszym etapie do przyłączanie się ich do zewnętrznej powierzchni fosfolipidów tworzących błony cytoplazmatyczne, w pobliżu pomp RND. Następnie związki te

przenikają na drodze dyfuzji do przedsionków, za pośrednictwem których dostają się do miejsca aktywnego transportera RND położonego w części peryplazmatycznej. W ten sposób aktywnie usuwana jest np. karbenicylina oraz ceftriakson. Natomiast w przypadku substancji występujących w cytoplazmie następuje prawdopodobnie ich bezpośredni transport do części miejsca aktywnego, położnego w błonie cytoplazmatycznej. Do takich substratów pomp zaliczamy np. chinolony.

Pompy z rodziny ABC występujące u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych zbudowane są z białek, które tworzą kanał transportowy w błonie cytoplazmatycznej. W budowie tych białek wyróżniamy dwie ważne domeny – hydrofobową związaną z błoną oraz hydrofilową domenę NBD (nucletide-binding domein) zawierającą charakterystyczne konserwatywne sekwencje biorące udział w hydrolizie ATP [12, 17, 23]. Zasadniczo pompy te mają budowę białkowych homodimerów. Dotychczas u pałeczek Gram-ujemnych opisano jedynie kilka pomp należących do rodziny ABC. Są to pompy MsbA występujące u *E. coli* oraz VcaM u non-O1 *Vibrio cholerae*. W odróżnieniu od nich, pompa SmdAB opisana u *Serratia marcescens* ma budowę heterodimeru [17]. Zarówno białko SmdA jak i SmdB posiadają charakterystyczne konserwatywne sekwencje niezbędne do hydrolizy ATP. Unikatową budowę wśród rodziny ABC posiada pompa MacAB [12]. Białko MacA jest położone w przestrzeni peryplazmatycznej i jednocześnie umocowane w błonie cytoplazmatycznej. Natomiast MacB jest białkiem błony cytoplazmatycznej. Białka te tworzą kompleks MacAB, który łącząc się z białkiem TolC (jedno z ważniejszych białek OMP) tworzą trzyskładnikowy system pompy rodziny ABC. Obecność systemów MacAB-TolC wykazano u szczepów *E. coli* i *S. enterica* serovar Typhimurium. System MacAB-TolC podobnie jak pompy z rodziny RND aktywnie usuwa związki bezpośrednio na zewnątrz komórki bakteryjnej.

Pompy zaliczane do pozostałych trzech rodzin, tj. MFS, SMR oraz MATE zbudowane są z białek, które tworzą transportery położone w błonie cytoplazmatycznej [23]. U pałeczek Gram-ujemnych transportują one związki z wnętrza komórki do przestrzeni peryplazmatycznej. W dalszym etapie związki te są usuwane na zewnątrz komórek poprzez kanały OMP. Wyjątkową budową charakteryzuje się pompa EmrAB zaliczana do klasy MFS [8]. Jej obecność wykazano u *E. coli*. Podobnie jak systemy RND i MacAB-TolC pompa EmrAB składa się z dwóch grup białek – transportera w błonie cytoplazmatycznej i grupy białek zakotwiczonych w błonie, a położonych w przestrzeni peryplazmatycznej. Kompleks EmrAB łączy się z kanałem TolC aktywnie usuwając związki bezpośrednio na zewnątrz komórki bakteryjnej.

3. Zakres substratowy pomp MDR

Zazwyczaj u pałeczek Gram-ujemnych występują jednocześnie pompy należące do różnych klas. Główną rolę w oporności pałeczek na antybiotyki odgrywają systemy pomp RND [23, 25, 26]. Systemy te charakteryzują się szerokim zakresem substratowym. Mają one zdolność aktywnego usuwania na zewnątrz komórki jednocześnie kilku różnych klas antybiotyków (głównie chinolonów, tetracyklin, chloramfenikolu, aminoglikozydów, β-laktamów, erytromycyny) oraz bromku etydyny, SDS, triklosanu, a także rozpuszczalników organicznych. Zwiększona ekspresja genów kodujących systemy pompy RND powoduje oporność lub obniżoną wrażliwość szczepów na szereg różnych grup antybiotyków, które wchodzą w zakres substratowy tych pomp. U szczepów tych wykazano 2–8-krotny wzrost wartości MIC antybiotyków w porównaniu do szczepów o niezmienionym poziomie ekspresji genów. Przy czym występowanie dodatkowych mechanizmów oporności (np. β-laktamaz, enzymów inaktywujących aminoglikozydy czy mutacji w topoizomerazie IV oraz gyrazie DNA) znacznie zwiększa poziom oporności szczepów klinicznych na β-laktamy, aminoglikozydy oraz fluorochinolony. Największą liczbę systemów pomp z klasy RND wykazano u *P. aeruginosa*. Dotychczas opisano występowanie u tego gatunku 11 systemów RND, przy czym tylko jeden z nich (system CzcCBA) nie bierze udziału w aktywnym usuwaniu antybiotyków z komórki, a z pozostałych 9 systemów to pompy z grupy Mex (broadly-specific **m**ultidrug **e**ffl**ux** systems). Zakresy substratowe dla poszczególnych systemów pomp podano w tabeli I.

Charakterystyczną cechą pomp Mex jest ich udział w aktywnym usuwaniu laktonów acylohomoseryny (autoinduktorów w procesie QS – Quorum Sensing). Ponadto 6 systemów RND z grupy Mex opisano dopiero w ostatnich latach – zaliczamy do nich MexJK-OprM/OpmH, MexVW-OprM [25], MexGHI-OpmD [1], MexPQ-OpmE, MexMN-OprM [19] oraz TriABC-OpmH [18]. Nieznany jest jeszcze w pełni zakres substratowy tych pomp ani mechanizmy regulujące ekspresję kodujących je genów. Nie wiadomo także, z jaką częstością występują te pompy u szczepów klinicznych oraz czy są obecne u szczepów środowiskowych.

Równie szeroki zakres substratowy posiadają systemy pomp AcrAB-TolC oraz AcrEF-TolC (tabela II).

Obecność obydwu pomp wykazano u *E. coli* [23], a ponadto AcrAB-TolC powszechnie występuje u *S. enterica* sv. Typhimurium [2]. Systemy pomp AcrAB-TolC, AcrEF-TolC (u ww. gatunków) oraz MexAB-OprM i MexXY-OprM (u *P. aeruginosa*) warunkują „naturalną" oporność lub obniżoną wrażliwość szczepów środowiskowych oraz klinicznych na szereg antybiotyków i chemioterapeutyków [23].

Tabela I

Zakres substratowy systemów pomp RND występujących u wybranych gatunków Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących

Bakterie	Elementy systemów pomp RND			Substraty systemów pomp	Piśmiennictwo
	MFP	RND	OMF		
Pseudomonas aeruginosa	MexA	MexB	OprM	chinolony, makrolidy, tetracykliny, tigecyklina, linkomycyna, chloramfenikol, nowobiocyna, trimetoprim, sulfonamidy, β-laktamy poza imipenememem, triklosan, SDS, węglowodory aromatyczne, laktony homoseryny, tiolaktomycyna, fiolet krystaliczny, bromek etydyny	[25, 26]
	MexC	MexD	OprJ	chinolony, makrolidy, tetracykliny, tigecyklina, linkomycyna, chloramfenikol, nowobiocyna, penicyliny poza karbenicyliną, cefalosporyny poza ceftazydymem, meropenem, sulfonamidy, trimetoprim, triklosan, fiolet krystaliczny, węglowodory aromatyczne, SDS, bromek etydyny	
	MexX	MexY	OprM	aminoglikozydy, makrolidy, tetracykliny, tigecyklina, chinolony, linkomycyna, chloramfenikol, penicyliny poza karbenicyliną, cefalosporyny poza ceftazydymem, meropenem	
	MexE	MexF	OprN	chinolony, chloramfenikol, trimetoprim, triklosan, laktony homoseryny, węglowodory aromatyczne	[15, 25, 26]
	MexJ	MexK	OprM	tetracykliny, erytromycyna	[25, 26]
			OpmH	triklosan	
	MexV	MexW	OprM	chinolony, chloramfenikol, tetracykliny, erytromycyna, bromek etydyny	[25]
	MexGH	MexI	OpmD	norfloksacyna, laktony homoseryny, bromek etydyny	[1]
	MexM	MexN	OprM	chloramfenikol	[19]
	MexP	MexQ	OpmE	erytromycyna, chinolony, tetracyklina, chloramfenikol	
	TriAB	TriC	OpmH	triklosan	[18]
Stenotrophomonas maltophilia	SmeD	SmeE	SmeF	chinolony, tetracykliny, chloramfenikol, erytromycyna, triklosan	[5, 26]
	SmeA	SmeB	SmeC	aminoglikozydy, fluorochinolony, β-laktamy	
Acinetobacter baumannii	AdeA	AdeB	AdeC	fluorochinolony, aminoglikozydy, chloramfenikol, erytromycyna, tetracykliny, β-laktamy, bromek etydyny	[29]
	AdeI	AdeJ	AdeK	fluorochinolony, chloramfenikol, tetracyklina, erytromycyna, β-laktamy, linkosamidy, kwas fusydowy, nowobiocyna, ryfampicyna, trimetoprim, SDS	

Pozostałe rodziny pomp (tj. ABC, MFS, SMR oraz MATE) występujące u pałeczek Gram-ujemnych mogą warunkować oporność szczepów na jeden lub dwa konkretne antybiotyki lub grupę antybiotyków (tabela III).

4. Geny kodujące białka pomp i ich ekspresja

Jeszcze do niedawna uważano, że geny kodujące wszystkie znane systemy pomp MDR u pałeczek Gram-ujemnych zlokalizowane są w chromosomach bakteryjnych [23]. Jednakże w ostatnich latach opisano występowanie nowych pomp OqxAB [9, 10] oraz QepA [31], które są kodowane przez geny zlokalizowane w plazmidach koniugacyjnych. O ile operon kodujący system OqxAB występował u szczepów *E. coli* izolowanych od świń, to obecność pompy QepA wykazano u dwóch izolatów klinicznych *E. coli* – jeden z nich pochodził z Japonii, drugi natomiast z Belgii. Obydwa plazmidy oprócz genów kodujących pompę QepA zawierały również geny *rmtB* (kodujące rybosomalną metylotransferazę), co w konsekwencji warunkowało oporność szczepów na hydrofilowe chinolony. Określono wielkość jednego z plazmidów na ok. 100 tys. par zasad. W Japonii przebadano 751 szczepów klinicznych *E. coli*, izolowanych w latach 2002–2006 w 140 szpitalach, w celu poszukiwania izolatów posiadających geny *qepA*. Jedynie u dwóch szczepów stwierdzono obecność takich genów [31]. Ostatnio wykazano u szczepów klinicznych pałeczek Gram-ujemnych obecność także genów *cml* na ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy czy transpozony [27].

W przypadku systemów pomp z rodziny RND oraz MacAB-TolC (system ABC), które zbudowane są z trzech grup białek, geny je kodujące tworzą operony zlokalizowane w chromosomach [23]. Najczęściej w skład operonów wchodzą kolejno: promotor dla genów kodujący białka pompy, gen kodujący białko MFP, gen kodujący białko transportera w błonie cytoplazmatycznej, a w przypadku operonów „pomp RND" także gen kodujący białko OMF. Jednakże w przypadku niektórych systemów pomp RND, geny kodujące białka OMF położone są w znacznej odległości od

Tabela II

Zakres substratowy systemów pomp RND występujących u wybranych gatunków pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*

Bakterie	System pomp	Substraty systemów pomp	Piśmiennictwo
Escherichia coli	AcrAB-TolC	chloramfenikol, makrolidy, β-laktamy, chinolony, tetracykliny, tigecyklina, ryfampicyna, oksazolidynony, kwas fusydowy, triklosan, czwartorzędowe sole amoniowe, bromek etydyny, sole żółciowe, SDS, triton X-100	[6, 25, 26]
	AcrEF-TolC	chinolony, tetracykliny, trimetoprim, makrolidy, β-laktamy, oksazolidynony, sole żółciowe, SDS	[25, 26]
	AcrAD-TolC	aminoglikozydy, nowobiocyna, niektóre β-laktamy, SDS	[25, 26]
	MdtABC-TolC	nowobiocyna, niektóre β-laktamy, SDS, sole żółciowe	[25]
	YhiUV-TolC (MdtEF-TolC)	erytromycyna, nowobiocyna, bromek etydyny, fiolet krystaliczny, SDS, chlorek benzalkoniowy	[25, 26]
	OqxAB-TolC	chloramfenikol, bromek etydyny	[9, 10]
Serratia marcescens	SdeXY	erytromycyna, tetracyklina, norfloksacyna, triklosan, chlorek benzalkoniowy, chlorheksydyna, bromek etydyny	[25, 26]
	SdeAB	fluorochinolony, chloramfenikol, SDS, bromek etydyny	[13]
	SdeCDE	fluorochinolony, chloramfenikol, SDS, bromek etydyny	[3]
Klebsiella pneumoniae	AcrAB-KocC	chinolony, erytromycyna, β-laktamy, tetracykliny, bromek etydyny, SDS	[14]
Enterobacter aerogenes	AcrAB-TolC	chloramfenikol, makrolidy, chinolony, tetracyklina, nowobiocyna, SDS	[6, 16]
	EefABC	chloramfenikol, makrolidy	[16]
E. cloaceae	AcrAB-TolC	makrolidy, chinolony, niektóre β-laktamy	[22]
Proteus mirabilis	AcrAB-TolC	chinolony, chloramfenikol, erytromycyna, nowobiocyna, SDS, bromek etydyny, tigecyklina,	[23]
Salmonella enterica serovar Typhimurium	AcrAB-TolC	chinolony, niektóre β-laktamy, chloramfenikol, tetracyklina, triklosan, sole żółciowe	[2, 26]
Morganella morganii	AcrAB	tigecyklina	[23]

Tabela III

Zakres substratowy systemów pomp ABC, MFS, MATE, SMR występujących u wybranych gatunków Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących oraz u pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*

Bakterie	System pomp	Rodzina pompy	Substraty systemów pomp	Piśmiennictwo
P. aeruginosa	CmlA	MFS	chloramfenikol	[27]
	PmpM	MATE	fluorochinolony, chlorek benzalkoniowy, bromek etydyny	[23]
	EmrE	SMR	aminoglikozydy, bromek etydyny	[25]
A. baumannii	Tet(A)	MFS	tetracyklina	[29]
	Tet(B)	MFS	tetracyklina, minocyklina	
	MdfA	MFS	chloramfenikol, cyprofloksacyna	
	CmlA	MFS	chloramfenikol	
	AbeM	MATE	niektóre fluorochinolony (cyprofloksacyna, ofloksacyna, norfloksacyna), gentamycyna, daunorubicyna, doksorubicyna, triklosan, bromek etydyny	
E. coli	MacAB-TolC	ABC	makrolidy	[8, 12]
	EmrAB-TolC	MFS	kwas nalidyksowy	[8]
	EmrD	MFS	chinolony, chloramfenikol	[25]
	MdfA (Cmr lub CmlA)	MFS	chloramfenikol, fluorochinolony, aminoglikozydy, erytromycyna, tetracykliny, ryfampicyna, chlorek benzalkoniowy, bromek etydyny	[7, 26]
	QepA	MFS	fluorochinolony	[31]
	YdhE (NorE)	MATE	fluorochinolony, aminoglikozydy, barwniki	[25]
	EmrE	SMR	tetracykliny, chlorek benzalkoniowy, bromek etydyny	[25, 26]
S. marcescens	SmdAB	ABC	norfloksacyna, tetracyklina	[17]
	SmfY	MFS	norfloksacyna, chlorek benzalkoniowy, bromek etydyny	[28]
	SsmE	SMR	bromek etydyny	[20]
K. pneumoniae	KmrA	MFS	aminoglikozydy, norfloksacyna, bromek etydyny	[21]
	KdeA	MFS	norfloksacyna, chloramfenikol, bromek etydyny	[24]

operonu i ulegają ekspresji niezależnej od ekspresji operonu „pompy", np. u *E. coli* dotyczy to operonu *acrAB* i genu *tolC*, a u *P. aeruginosa* operonu *mexXY* i genu *oprM*. Przed operonami „pomp" położone są lokalne geny regulatorowe.

Ekspresja operonów „pomp" jest kontrolowana przede wszystkim przez lokalne geny regulatorowe, ale także przez globalne geny regulatorowe [23]. Większość operonów podlega „negatywnej" regulacji przez produkt lokalnego genu regulatorowego, który koduje białko o aktywności represora. Represor wiąże się z regionem operator-promotor operonu „pomp" i powoduje obniżenie poziomu transkrypcji operonu. W tabeli IV podano represory regulujące ekspresję operonów kodujących systemy pomp, najistotniejsze z punktu widzenia lekooporności bakterii.

W inny sposób regulowana jest ekspresja operonu kodującego białka pompy MexEF-OprN, występującego u *P. aeruginosa*. Ekspresja tego operonu podlega „dodatniej" regulacji przez produkt lokalnego genu regulatorowego *mexT*, który koduje białko o aktywności aktywatora. Ostatnio wykazano, iż ekspresja operonu „pompy MexEF-OprN" jest także regulowana przez produkt genu *mexS*, który zlokalizowany jest w chromosomie tuż przed genem *mexT*. Białko MexS jest represorem tego operonu. Mutacje w genie *mexS* powodują wzrost ekspresji operonu „pompy MexEF-OprN", a także obniżenie produkcji białka porynowego OprD – co powoduje wzrost oporności bakterii na imipenem (odkryto u szczepu klinicznego). Ponadto wykazano, iż w komórkach szczepów dzikich posiadających system MexEF-OprN występują różne warianty genu regulatorowego *mexT*, co powoduje syntezę zmodyfikowanych białek regulatorowych mexT. W konsekwencji obserwowany jest różny poziom ekspresji operonu „pompy MexEF-OprN". U wielu szczepów stwierdzono niski poziom ekspresji tego operonu.

Obecnie także wiadomo, że operon kodujący system pomp może być kontrolowany przez więcej niż dwa lokalne geny regulatorowe [23]. Takim systemem jest MexAB-OprM, występujący zarówno u szczepów środowiskowych jak i klinicznych *P. aeruginosa*. Ekspresja operonu *mexAB* podlega regulacji przez trzy lokalne geny regulatorowe: *mexR, nalC* oraz *nalD*. Wszystkie geny kodują białka o aktywności represora. Opisano także występowanie w operonie *mexAB* dwóch promotorów zlokalizowanych obok siebie. Wiadomo, iż jeden z nich jest miejscem przyłączania białka regulatorowego NalD, a drugi białka MexR.

Jeszcze inny sposób regulacji operonów „pomp RND" opisano w przypadku pompy AdeABC u *Acinetobacter baumannii* [29]. Operon „pompy", który tworzą kolejno geny *adeA, adeB* oraz *adeC*, jest poprzedzony operonem *adeRS*. Ekspresja *adeABC* jest tutaj regulowana przez dwuskładnikowy system regulatorowy AdeRS, który zaliczany jest do dwuskładnikowych systemów transdukcji TCST (two-component signal transduction system). Systemy TCST są powszechnie występującymi mechanizmami regulującymi podstawowe funkcje tak w komórkach bakteryjnych jak i w eukariotycznych. Transkrypcja operonów kodujących białka sytemów TCST przebiega w odwrotnym kierunku niż transkrypcja operonów „pomp". Białko AdeS jest kinazą histydynową pełniącą rolę „sensora". Aktywność kinazy w systemach TCST jest regulowana przez czynniki środowiskowe. Białko to zawiera dwie istotne domeny His-box oraz Hpt (second type of His-acceptor domain), w których dochodzi do autofosforylacji reszt histydynowych. W następnym etapie fosforyzacji ulegają reszty kwasu asparaginowego w domenie białka regulatorowego AdeR, co w konsekwencji aktywuje ekspresję operonu *adeABC*. Występowanie podobnych dwuskładnikowych systemów regulatorowych TCST, które aktywują transkrypcję operonów „pomp", opisano także w przypadku kilku innych pomp z rodziny RND: MdtABC i MdtEF u *E. coli* oraz SmeABC u *S. maltophilia* [23].

Ekspresja operonów „pomp" oprócz regulacji poprzez białka kodowane przez lokalne geny regulatorowe jest także kontrolowana przez produkty globalnych

Tabela IV

Lokalne białka regulatorowe kontrolujące ekspresję operonów kodujących wybrane systemy pomp RND u pałeczek Gram-ujemnych [23]

Bakterie	Systemy pomp MDR	Białka regulatorowe	
		Represor	Aktywator
P. aeruginosa	MexAB-OprM	MexR, NalC, NalD	
	MexCD-OprJ	NfxB	
	MexXY-OprM	MexZ	
	MexEF-OprN	MexS	MexT
	MexJK-OprM/OpmH	MexL	
E. coli, *P. mirabilis*, *E. aerogenes*, *S. enterica* sv. Typhimurium	AcrAB-TolC	AcrR	
E. coli	AcrEF-TolC	AcrS	

genów regulatorowych [23]. U pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* występują cztery grupy białek (tj. Mar, Sox, Rob i Ram), które pełnią rolę globalnych regulatorów genów kodujących pompy. Białka te pełnią rolę transkrypcyjnych aktywatorów zaliczanych do rodziny XylS/AraC. Najpełniej udokumentowano ich wpływ na syntezę pomp z rodziny RND, a w tym na aktywność pompy AcrAB-TolC. U szczepów *E. coli* oraz *S. enterica* ekspresja operonu *acrAB* jest aktywowana przede wszystkim przez białka MarA (kodowane przez operon *marRAB*) oraz SoxS (kodowane przez operon *soxRS*). Dodatkowo u szczepów *E. coli* w regulacji tego operonu „pompy" biorą także udział białka grupy Rob. U szczepów z innych rodzajów niż *Escherichia* w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae* najważniejszym globalnym regulatorem jest białko RamA. Jego dominujący udział w kontroli ekspresji operonu *acrAB* opisano u szczepów *S. enterica* sv. Typhimurium, *E. aerogenes* oraz *K. pneumoniae*. Natomiast w przypadku Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących najlepiej poznano dotychczas systemy regulujące pompy Mex u *P. aeruginosa*. Najważniejszym globalnym genem regulatorowym u tego gatunku jest białko SoxR. U wielolekoopornych szczepów klinicznych *P. aeruginosa* wykazano, że regulator SoxR jest odpowiedzialny za zwiększony poziom ekspresji genów kodujących dwie pompy Mex, tj. MexAB-OprM i MexEF-OprN lub pompy MexAB-OprM i MexXY-OprM.

Większość systemów RND kodowana jest przez geny, których ekspresja zwiększa się gdy w środowisku znajduje się substrat dla danej pompy. Przykładem natomiast systemów, które kodowane są przez operony ulegające ekspresji konstytutywnej są dwie pompy MexAB-OprM i MexXY-OprM u *P. aeruginosa*. Najczęstszą przyczyną znacznego stałego zwiększenia poziomu syntezy białek tworzących pompy i/lub aktywności systemów są mutacje w genach regulatorowych. U większości szczepów klinicznych zjawisko „overexpression of MDR pomps" jest związane z mutacjami w lokalnych genach regulatorowych kodujących represora [23].

5. Podsumowanie

Oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki pałeczek Gram-ujemnych uwarunkowana jest występowaniem w komórkach bakteryjnych kilku niezależnych mechanizmów oporności, takich jak systemy pomp, β-laktamazy (szczególnie typu ESβL, metalo-β-laktamazy), enzymy inaktywujące związki, np. aminoglikozydy, czy zmiany w miejscu docelowego działania antybiotyków. Systemy pomp MDR są jednym z podstawowych i powszechnie występujących mechanizmów oporności pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz *Pseudomonas* spp. i *A. baumannii* na związki przeciwbakteryjne. Główną rolę w oporności tych pałeczek na antybiotyki odgrywają systemy pomp RND, które charakteryzują się szerokim zakresem substratowym. Mają one zdolność aktywnego usuwania na zewnątrz komórki jednocześnie kilku związków z różnych klas antybiotyków, chemioterapeutyków, środków dezynfekcyjnych oraz bromku etydyny, SDS, a także rozpuszczalników organicznych. Ekspresja genów kodujących pompy może być kontrolowana jednocześnie przez różne regulatory, w tym globalne geny regulatorowe. Wykazano zależność pomiędzy poziomem aktywności systemów pomp, a poziomem syntezy białek OMP [30]. U pałeczek *Enterobacteriaceae* globalny regulator MarA jest z jednej strony aktywatorem operonów „pomp", a ponadto represorem w systemie kontrolowania ekspresji genów kodujących kanały OMP. Podsumowując, na poziom oporności szczepów na antybiotyki ma wpływ zarówno aktywność różnych systemów MDR, jak również obniżenie liczby aktywnych kanałów OMP (odpowiadających za wnikanie antybiotyków do wnętrza komórki tzw. influx). Ponadto u pałeczek Gram-ujemnych aktywność systemów pomp MDR ma związek ze zjawiskiem QS, zdolnością szczepów do wzrostu w postaci biofilmu oraz ze zjadliwością szczepów.

Piśmiennictwo

1. Aendekerk S., Ghysels B., Cornelis P., Baysse C.: Characterization of a new efflux pump MexGHI-OpmD from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadinum. *Microbiol*. **148**, 2371–2381 (2002)
2. Baucheron S., Tyler S., Boyd D., Mulvey M.R., Chaslus-Dancla E., Cloeckaert A.: AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**, 3729–3735 (2004)
3. Begic S., Worobec E.A.: Characterization of the *Serratia marcescens* SdeCDE multidrug efflux pump studied via gene knockout mutagenesis. *Can. J. Microbiol*. **54**, 411–416 (2008)
4. Borges-Walmsley M.I., McKeegan K.S., Walmsley A.R.: Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J*. **376**, 313–338 (2003)
5. Chang L.L., Chen H.F., Chang C.Y., Lee T.M., Wu W.J.: Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia. J. Antimicrob. Chemother*. **53**, 518–521 (2004)
6. Chollet R., Chevalier J., Bryskier A., Pagès J.M.: The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**, 3621–3624 (2004)
7. Edgar R., Bibi E.: MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J. Bacteriol*. **179**, 2274–2280 (1997)

8. Elkins C.A., Mullis L.B.: Substrate competition studies using whole-cell accumulation assays with the major tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 923–929 (2007)
9. Hansen L.H., Johannesen E., Burmřlle M., Sřrensen A.H., Sørensen S.J.: Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in *Escherichia coli*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*. **48**, 3332–3337 (2004)
10. Hansen L.H., Sřrensen S.J., Jřrgensen H.S., Jensen L.B.: The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquindox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microb. Drug Resist*. **11**, 378–382 (2005)
11. Higgins M.K., Bokma E., Koronakis E., Hughes C., Koronakis V.: Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci*. *USA*, **101**, 9994–9999 (2004)
12. Kobayashi N., Nishino K., Yamaguchi A.: Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **183**, 5639–5644 (2001)
13. Kumar A., Worobec E.A.: Cloning, sequencing, and characterization of the SdeAB multidrug efflux pump of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **49**, 1495–1501 (2005)
14. Li D.W., Onishi M., Kishino T., Matsuo T., Ogawa W., Kuroda T., Tsuchiya T.: Properties and expression of a multidrug efflux pump AcrAB-KocC from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Pharm. Bull*. **31**, 577–582 (2008)
15. Maseda H., Yoneyama H., Nakae T.: Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 658–664 (2000)
16. Masi M., Saint N., Molle G., Pagčs J.M.: The *Enterobacter aerogenes* outer membrane efflux proteins TolC and EefC have different channel properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 2559–2567 (2007)
17. Matsuo T., Chen J., Minato Y., Ogawa W., Mizushima T., Kuroda T., Tsuchiya T.: SmdAB, a heterodimeric ABC-Type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol*. **190**, 648–654 (2008)
18. Mima T., Joshi S., Gomez-Escalada M., Schweizer H.P.: Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J. Bacteriol*. **189**, 7600–7609 (2007)
19. Mima T., Sekiya H., Mizushima T., Kuroda T., Tsuchiya T.: Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol*. **49**, 999–1002 (2005)
20. Minato Y., Shahcheraghi F., Ogawa W., Kuroda T., Tsuchiya T.: Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 516–519 (2008)
21. Ogawa W., Koterasawa M., Kuroda T., Tsuchiya T.: KmrA multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Pharm. Bull*. **29**, 550–553 (2006)
22. Pérez A., G. Bou i wsp.: Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 3247–3253 (2007) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
23. Piddock L.J.: Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev*. **19**, 382–402 (2006)
24. Ping Y., Ogawa W., Kuroda T., Tsuchiya T.: Gene cloning and characterization of KdeA, a multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Pharm. Bull*. **30**, 1962–1964 (2007)
25. Poole K.: Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect*. **10**, 12–26 (2004)
26. Poole K.: Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother*. **56**, 20–51 (2005)
27. Schwarz S., Kehrenberg C., Doublet B., Cloeckaert A.: Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev*. **28**, 519–542 (2004)
28. Shahcheraghi F., Minato Y., Chen J., Mizushima T., Ogawa W., Kuroda T., Tsuchiya T.: Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens. Biol. Pharm. Bull*. **30**, 798–800 (2007)
29. Vila J., Martí S., Sánchez-Céspedes J.: Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii. J. Antimicrob. Chemother*. **59**, 1210–1215 (2007)
30. Viveiros M., Dupont M., Rodrigues L., Couto I., Davin-Regli A., Martins M., Pagès J.M., Amaral L.: Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli. PLoS ONE*, **2**, e365 (2007)
31. Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Arakawa Y.: Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother*. **52**, 1564–1566 (2008)
32. Yu E.W., Aires J.R., Nikaido H.: AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J. Bacteriol*. **185**, 5657–5664 (2003)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 423–429
http://www.pm.microbiology.pl

MOLEKULARNE MECHANIZMY OPORNOŚCI NA LEKI PRZECIWBAKTERYJNE U *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Andrzej Młynarczyk, Grażyna Młynarczyk*

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, tel. (22) 628 27 39
* Autor korespondencyjny: e-mail: grazyna.mlynarczyk@wum.edu.pl

1. Wstęp. 2. Mechanizmy oporności na antybiotyki β-laktamowe. 2.1. Kasety SCCmec. 3. Oporność na makrolidy, ketolidy, linkozamidy i streptograminy B. 4. Oporność na streptograminy A. 5. Oporność na chinupristinę/dalfopristinę (Synercid) 6. Oporność na aminoglikozydy. 7. Oporność na fluorochinolony. 8. Oporność na tetracykliny. 9. Oporność na linezolid. 10. Oporność na glikopeptydy. 11. Oporność na mupirocynę

Molecular mechanisms of resistance to antibacterial drugs in *Stahylococcus aureus*

Abstract: In this article, the most important molecular mechanisms of resistance of *Staphylococcus aureus* to the following antibiotics are discussed: β-lactams, glycopeptides, macrolides, lincosamides, streptogramins A and B, aminoglicosides, tetracyclines, oxazolidinones, fluoroquinolones and mupirocin.

1. Introduction. 2. Mechanisms of resistance to β-lactams. 2.1. The SCCmec. 3. Resistance to macrolides, ketolides, lincosamides and streptogramins B. 4. Resistance to streptogramins A. 5. Resistance to quinuprostine/dalfopristine (Synercid). 6. Resistance to aminoglycosides. 7. Resistance to fluoroquinolones. 8. Resistance to tetracyclines. 9. Resistance to linezolide. 10. Resistance to glycopeptides. 11. Resistance to mupirocin.

Słowa kluczowe: *S. aureus*, oporność, SCCmec, plazmidy, transpozony, MRSA, VISA, VRSA
Key words: *S. aureus*, resistance, SCCmec, plazmids, transposons, MRSA, VISA, VRSA

1. Wstęp

Gronkowce i wywoływane przez nie zakażenia towarzyszą ludzkości od zarania dziejów. Bakterie zaadoptowane do wykorzystywania organizmu człowieka jako swojego terytorium życiowego, przystosowywały się do wszelkich zmian trybu życia związanych z rozwojem cywilizacji. Szczególnym wyzwaniem było wynalezienie penicyliny, a później innych antybiotyków. Wkrótce po wprowadzeniu penicyliny do lecznictwa pojawiły się pierwsze szczepy *S. aureus* oporne na ten antybiotyk. Potem okazało się, że zjawisko nabywania oporności przez początkowo wrażliwe szczepy *S. aureus* występuje regularnie, w kilka do kilkunastu lat od wprowadzenia, na większość nowych antybiotyków. Największy problem spowodowało pojawienie się szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę (MRSA – methicillin resistant *S. aureus*, w odróżnieniu od MSSA – methicillin sensitive *S. aureus*). Oporność na metycylinę (i na wszystkie, jak dotąd, stosowane w lecznictwie antybiotyki β-laktamowe) opisano już w 1961 roku, jednak szczepy MRSA rozprzestrzeniły się dopiero wówczas, kiedy w szpitalach na masową skalę zaczęto stosować cefalosporyny. Przez wiele lat szczep MRSA był uważany za synonim szczepu szpitalnego (HA-MRSA – hospital aquired MRSA). W latach 90-tych XX wieku zaczęły pojawiać się nowe warianty szczepów MRSA u chorych niehospitalizowanych (CA-MRSA – community aquired MRSA). W tym okresie opisano również szczepy średnio-wrażliwe na wankomycynę (VISA – vancomycin intermediate *S. aureus*). W 2002 roku doniesiono o pojawieniu się pierwszych szczepów opornych na wankomycynę (VRSA – vancomycin resistant *S. aureus*) posiadających operon VanA w transpozonie Tn1546 opisany u rodzaju *Enterococcus* w 1968 roku. Szczepy MRSA, VISA i VRSA zaliczono w Polsce do tak zwanych szczepów alarmowych (Dz.U. Nr 54 poz. 484 z dn. 11.03.2005). W 2008 roku opisano pierwsze kliniczne szczepy *S. aureus* i *S. epidermidis* wytwarzające kodowaną przez plazmidy metylazę Cfr warunkującą oporność na linezolid [13].

2. Mechanizmy oporności na antybiotyki β-laktamowe

Oporność na β-laktamy u *S. aureus* może być wynikiem jednego lub kilku następujących mechanizmów: synteza PBP2a kodowanego przez gen *mecA* zlokalizowany w kasetach SCCmec (MRSA), mutacje w PBP2 i PBP4 (MODSA) oraz synteza β-laktamaz (penicylinaz) o wąskim spektrum, kodowanych przez operon *blaI-blaR1-blaZ* występujący w plazmidach i transpozonach (np. Tn552, Tn4002, Tn4201). Opisano pojedyncze szczepy tzw. BORSA, u których synteza β-laktamazy warunkowała MIC oksacyliny 4–8 mg/L.

Największe znaczenie kliniczne mają MRSA. Szczepy MRSA, w odróżnieniu od metycylino-wrażliwych MSSA, syntetyzują nową, niepodatną na działanie antybiotyków β-laktamowych transpeptydazę PBP2A

(PBP2a lub PBP2'), która przejmuje funkcję innych, zinaktywowanych PBP. Jest ona odpowiedzialna za tworzenie mostków pentaglicynowych pomiędzy łańcuchami peptydoglikanu, co umożliwia syntezę ściany komórkowej i powoduje oporność MRSA na wszystkie stosowane aktualnie w lecznictwie antybiotyki β-laktamowe. Być może, znajdujący się w III fazie badań klinicznych ceftobiprol, będzie pierwszym antybiotykiem β-laktamowym działającym na MRSA. Za kryterium oporności MRSA przyjmuje się MIC dla oksacyliny ≥4 mg/L [21]. Ekspresja PBP2A może być indukcyjna lub konstytutywna. [15].

2.1. Kasety SCCmec

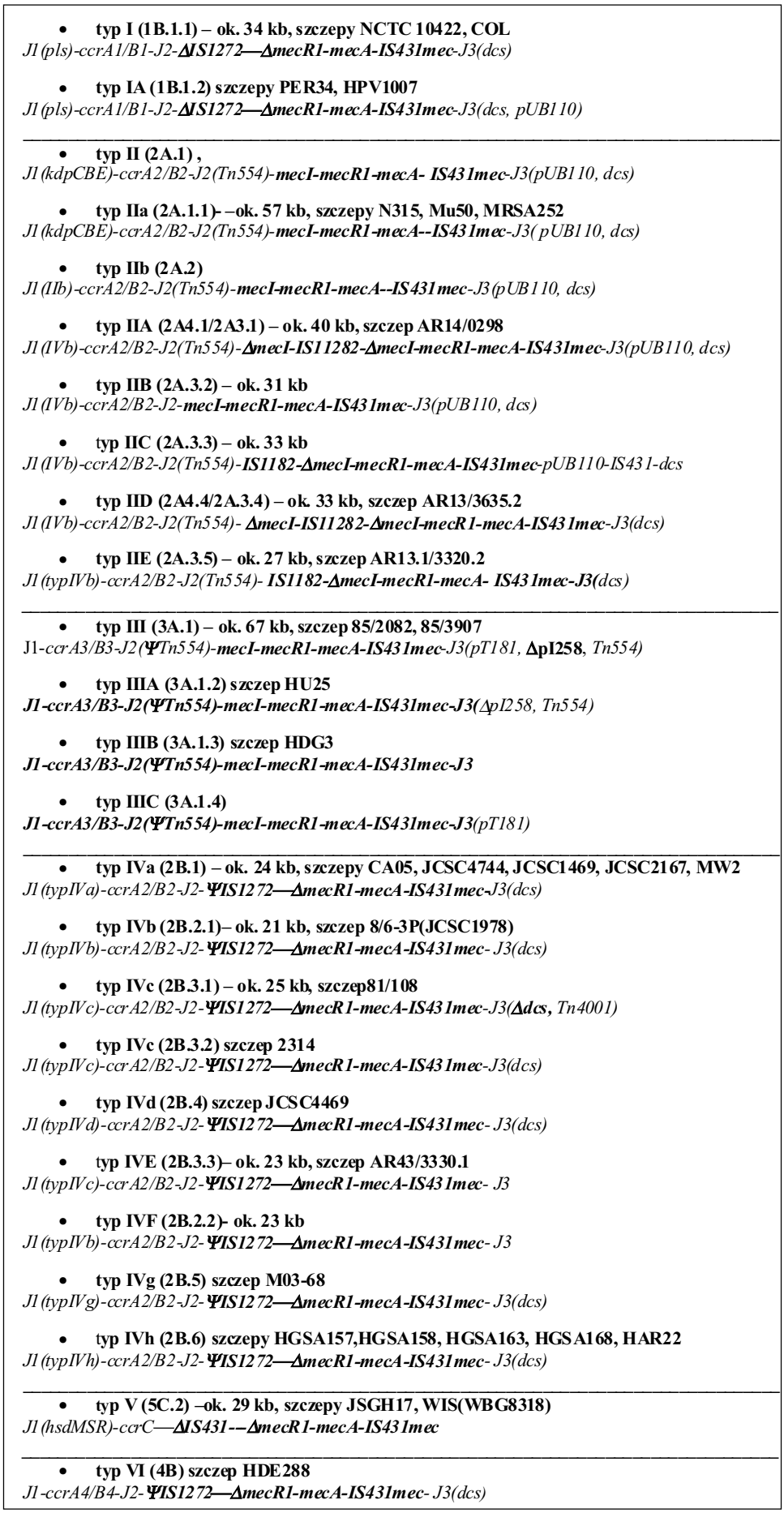
Synteza PBP2A związana jest z obecnością w chromosomie gronkowca złocistego kompleksu genów *mec* (np. *mecI-mecR-mecA*) w obrębie kaset chromosomalnych SCCmec (ang. staphylococcal chromosomal cassette mec), zaliczanych do tzw. wysp genomowych (genomic islands – GI) [9]. Geny *mec* przekazywane są do szczepów wrażliwych łącznie z całą strukturą SCCmec. Opisano i zsekwencjonowano sześć głównych typów SCCmec oraz w obrębie typów głównych kilka podtypów [8, 22, 23]. Opisane SCCmec mają wielkość od 21 do 68 tys nukleotydów (od 21 do 97 orf). W budowie kaset SCCmec wyszczególnia się najczęściej 5 regionów: J1-ccr-J2-mec-J3. Podział SCCmec na typy główne związany jest z typem rekombinazy chromosomalnej Ccr (1–5) i klasą regionu mec (A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, D, E), różniących się stopniem delecji genów regulatorowych *mecI-mecR.*(*ΔmecR1*) oraz ich sąsiedztwem i odległością od kompletnych lub zredukowanych (*Δ*, *Ψ*) sekwencji insercyjnych IS431, IS1182 i IS1272 [26]. Podział na podtypy oparty jest na podklasach regionu *mec* i budowie regionów J1, J2, i J3.

Klasyczny podział poznanych do roku 2008 kaset SCCmec obejmuje typy I–VI i w ich obrębie podtypy oznaczane małymi lub dużymi literami. W nawiasie podano propozycję nowego nazewnictwa (nr *ccr*, klasa *mec*, podklasa *mec*, wariant SCCmec) [2]. Poniżej przedstawiono schematy opisanych dotychczas kaset SCCmec. [8, 14, 22, 23, 26].

Określenie typu SCCmec jest jedną z wielu metod typowania MRSA. Ponadto do najczęściej stosowanych metod typowania należą: PFGE, MLST (MLSTCC, MLSTST), typ *spa*, typ *coa,* fagotypowanie i inne [4, 15].

3. Oporność na makrolidy, ketolidy, linkozamidy i streptograminy B

Antybiotyki z grupy makrolidów, linkozamidów i streptogramin B (MLS-B) wykazują ten sam mechanizm działania na komórkę bakteryjną. Punktem docelowym dla tych antybiotyków jest czteronukleotydowy fragment rRNA (w regionie peptydylotransferazy) w obrębie V domeny 23S rRNA, w podjednostce 50S rybosomu. Kryterium oporności na MLS-B, to MIC erytromycyny, klarytromycyny, dirytromycyny, azytromycyny ≥8 mg/L; MIC telitromycyny, klindamycyny ≥4 mg/L [21]. Istnieją różne mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki należące do tej grupy. Najczęściej występuje mechanizm polegający na modyfikacji miejsca docelowego dla antybiotyku. Modyfikacja przeprowadzana jest przez enzymy adenylo-N-metylotransferazy Erm (erythromycin rybosome methylation), metylujące adeninę 2058, co prowadzi do oporności na wszystkie MLS-B. Synteza metylaz Erm może zachodzić konstytutywnie, wówczas szczepy wykazują oporność na wszystkie MLS-B, lub indukcyjnie, wówczas oporność występuje tylko na antybiotyki, które są induktorami syntezy metylazy: makrolidy o pierścieniu 14 członowym (M_{14} z wyjątkiem ketolidów np. erytromycynę, klarytromycynę, oleandomycynę) i 15-członowym (M_{15}, np azytromycynę). Oporność na pozostałe MLS-B wymaga obecności induktora, którym może być erytromycyna lub inny makrolid $M_{14–15}$. Wprowadzenie przez CLSI do badań rutynowych testu na indukcyjną oporność na MLS-B u gronkowców i paciorkowców miało na celu wykluczenie stosowania klindamycyny w przypadku chorych zakażonych bakteriami, które, mimo, że wykazują wrażliwość na klindamycynę, bardzo łatwo mogą stać się na nią oporne w trakcie leczenia. Indukcyjna oporność na MLS-B u *S. aureus* jest najczęściej warunkowana przez geny *ermA* lub *ermC*. Częstość powstawania wariantów konstytutywnych z indukcyjnych genów *ermA* określono na ok. 10^{-6}–10^{-8}, a w przypadku indukcyjnych genów *ermC*, częstość ta jest zwykle znacznie wyższa. Przyczyną powstawania wariantów konstytutywnych są delecje, duplikacje, insercje oraz stosunkowo rzadko mutacje punktowe, w regionie o wielkości ok. 200 pz, poprzedzającym koniec 5' genu *erm*. Różnice w częstości powstawania wariantów konstytutywnych związane są prawdopodobnie z różną lokalizacją oraz różną liczbą kopii na komórkę genów *ermA* i *ermC*. Gen *ermA*, występujący u *S. aureus* w chromosomie jako część transpozonu Tn554 (*ermA-spc*), ma jedno miejsce o wysokiej preferencji oraz drugie o 1000 × mniejszej preferencji do integracji z chromosomem. Tn554 występuje najczęściej w jednej kopii w przeliczeniu na chromosom. U szczepów MRSA Tn554 występuje dodatkowo w kasetach SCC*mec* typu II lub III. Gen *ermC* zlokalizowany jest najczęściej w obrębie małych plazmidów (np. pE194, pWBG738) o wielkości 2,5–5,0 kb, występujących w dużej liczbie kopii oraz w obrębie dużych plazmidów koniugacyjnych, np. pUSA03 (37 kb), gdzie występuje łącznie z genem *ileS* (oporność na mupirocynę) [5, 18, 27].



Rys. 1. Schemat budowy SCCmec*

* Objaśnienia zastosowanych skrótów zostały podane w tekście pracy

Regulacja ekspresji genów *ermA* i *ermC*, zachodzi na etapie translacji. Gen *ermA* poprzedzają w nici policistronowej dwa geny kodujące peptydy liderowe pepL i *pep1*, natomiast w przypadku *ermC* jeden, *pep*. Tworzone przez rRNA *pep* struktury spięte uniemożliwiają dostęp rybosomu do RBS (ang. ribosom binding site) dla genu *erm*. Dlatego przy braku induktora nie zachodzi synteza metylazy Erm. Natomiast, jeżeli wcześniej do rybosomu przyłączy się cząsteczka induktora ($M_{14–15}$) wówczas translacja peptydu liderowego zostanie przerwana i nie nastąpi odłączenie rybosomu. Powoduje to trwałe rozchylenie struktury spiętej mRNA, umożliwiając dostęp rybosomów do RBS dla genu *erm* i jego translację [17, 27]

U pojedynczych szczepów *S. aureus* opisywane były również inne mechanizmy oporności, takie jak synteza metylaz ErmGM (ermY), ErmB (często u szczepów VRSA), ErmF, synteza białek błonowych powodujących aktywny wypływ antybiotyku, MsrA (często u szczepów VRSA), MsrB (oporność na M_{14}S-B), MsrSA oporność na $M_{14–15}$S-B, MefA (oporność na M_{14}), metylotransferazy Cfr (oporność na linkozamidy) [13, 19, 28] oraz synteza enzymów inaktywujących MLS-B takich jak esterazy EreA, EreB (inaktywują M_{14} i M_{16}); nukleotydylotransferazy LinA, LinA1 lub LinA' (oporność tylko na linkomycynę), liazy VgbA i VgbB (inaktywują S-B), fosfotransferazy makrolidowej MphBM [19, 27]. Oporność może być również wynikiem mutacji genów chromosomalnych, kodujących rybosomalne białka L22 (oporność *S. aureus* na erytromycynę, telitromycynę, quinopristinę i quinopristinę/dalfopristinę) i L4 (oporność *S. aureus* na erytromycynę i spiramycynę) [19, 27].

4. Oporność na streptograminy A

Streptograminy A działają na 23SrRNA podjednostki 50S rybosomu, ale w innym miejscu niż MLS-B. Oporność na streptograminy A może być wynikiem wytwarzania acetylotransferaz kodowanych przez plazmidowe geny *vatA*, *vatB*, *vatC, vatD*, *vatE*, wiążących ATP białek błonowych odpowiedzialnych za aktywny wypływ streptogramin A kodowanych przez plazmidy i transpozony geny *vgaA*, *vgaB*, *vgaAv* (Tn5406), liaz kodowanych przez geny *vgbA* i *vgbB*, oraz metylotransferazy Cfr modyfikującej miejsce docelowe dla streptogramin A [6, 13].

5. Oporność na chinupristinę/dalfopristinę (Synercid)

Synergistyczne działanie streptogramin A (dalfopristiny) i B (chinupristiny) powoduje efekt bójczy u *S. aureus* (w tym u MRSA, VRSA, VISA). Po stosowaniu Synercidu występuje efekt postantybiotykowy (PAE) tzn. hamowanie wzrostu bakterii przy stężeniu leku mniejszym niż MIC. Wartości PAE wynosiły dla: *S. aureus* 2–8 godz. [18]. Za kryterium oporności uważa się MIC synercidu ≥4 mg/L [21]. Oporność na Synercid jest najczęściej wynikiem obecności dwóch mechanizmów oporności: konstytutywnej oporności na MLS-B oraz oporności na streptograminy A. Obecność tylko jednego z tych mechanizmów powoduje, że Synercid nie działa bójczo tylko bakteriostatycznie (w badaniu bakteriologicznym takie bakterie wykazują wrażliwość na Synercid). Ponadto, mutacja chromosomalnego genu kodującego rybosomalne białko L22 powoduje oporność szczepu *S. aureus* na Synercid [18, 19].

6. Oporność na aminoglikozydy

Za kryterium oporności na aminoglikozydy przyjmuje się: MIC gentamycyny i tobramycyny ≥16 mg/L; MIC netylmycyny ≥32 mg/L; MIC amikacyny i kanamycyny ≥64 mg/L [21]. Najbardziej rozpowszechniony mechanizm oporności na aminoglikozydy polega na syntezie enzymów z grupy transferaz AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia (oporność na gentamycynę, tobramycynę, kanamycynę oraz często na amikacynę i netylmycynę), ANT(4')-Ia (oporność na tobramycynę, kanamycynę, neomycynę, liwidomycynę), APH(3")-IIIa (oporność na kanamycynę, neomycynę, liwidomycynę) i APH(3')-III (oporność na kanamycynę i neomycynę) kodowaną przez gen *aphA-3* występujący w Tn3851, Tn4031 i Tn5404 [28].

Geny *aacA-aphD* kodujące acetylo/fosfotransferazę AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia występują w transpozonach (np. Tn4001, Tn4001-like) zlokalizowanych w dużych plazmidach i chromosomie (np. SCCmec IVc). Niektóre Tn4001-like zachowały promotor operonu β-laktamazowego (zredukowany *blaZ*), co może powodować silną indukcję oporności na aminoglikozydy przez antybiotyki β-laktamowe i antagonizm β-laktamów i aminoglikozydów (np. netylmycyny) [7]. Niektóre mutacje punktowe genu *aacA-aphD* mogą rozszerzać spektrum AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia np. o arbekacynę. Gen *aadD* kodujący nukleotydylotransferazę ANT(4')-Ia występuje zarówno w małych (pUB110) i w dużych plazmidach np. koniugacyjnych. Kopia pUB110 występuje w niektórych SCCmec. Gen *aph(3")-IIIa* kodujący fosfotransferazę APH(3")-IIIa występuje najczęściej w plazmidach. Wysokie MIC >1024 mg/L lividomycyny pozwala fenotypowo odróżnić ten gen od pozostałych [7].

Ponadto *S. aureus* może syntetyzować transferazy, np. ANT(6), kodowaną przez gen *ant(6)* plazmidu pS194, lub *ant(6)-Ia* (*aadE*), inaktywujące streptomycynę. Oporność na streptomycynę może być również

wynikiem mutacji genu kodującego rybosomalne białko S12. Obniżona wrażliwość na aminoglikozydy może być wynikiem zakłócenia transportu aminoglikozydów do wnętrza komórki bakteryjnej [15, 28].

7. Oporność na fluorochinolony

Kryteria oporności to: MIC moksifloksacyny ≥2 mg /L; MIC ciprofloksacyny, lewofloksacyny 4 mg/L; MIC norfloksacyny ≥16 mg/L [21]. Przyczyną oporności na fluorochinolony są zmiany mutacyjne w obrębie genu *gyrA* i *gyrB* (topoizomeraza II) oraz *grlA* (topoizomeraza IV). W wyniku mutacji powstają białka o obniżonej podatności lub niewrażliwe na działanie fluorochinolonów [11, 15]. Opisano również nadprodukcję chromosomalnego białka NorA (aktywne usuwanie fluorochinolonów z komórki bakteryjnej) [15].

8. Oporność na tetracykliny

Kryterium oporności to: MIC tetracykliny, doksycykliny, minocykliny ≥16 mg/L [21]. Mechanizm oporności związany z aktywnym usuwaniem lub odłączaniem od 30S rybosomu i usuwaniem tetracyklin z komórki przez białka Tet(K), Tet(L), Tet(M), Tet(O), Tet(S) i Tet(U). Geny *tet(K)* występują w małych plazmidach (ok. 4,5 kb), np. pT181 (występuje również w SCCmec III), pT127, pBC16. Gen *tet(M)* występuje w chromosomie (np. Tn5801). Plazmidalne geny *tet(S)* i *tet(U)* są charakterystyczne dla szczepów VRSA [15, 28].

9. Oporność na linezolid

Linezolid należy do grupy oksazolidynonów, działa na 23 S rRNA w podjednostce 50S rybosomu i wykazuje dużą aktywność w stosunku do MSSA, MRSA, VRSA i VISA. Działanie linezolidu polega na wiązaniu się z konserwatywnym nukleotydem A2602, będącym częścią V domeny cząsteczki 23 S rRNA w podjednostce 50S, oraz z dwoma białkami na tej samej podjednostce: białkiem rybosomalnym L27, którego koniec N ściśle sąsiaduje z centrum aktywnym transferazy peptydylowej oraz z białkiem LepA [3]. Kryterium oporności to MIC ł8 mg/L [21]. Oporność na linezolid może być wynikiem dwóch mechanizmów: mutacji genu *rrn* lub ekspresji genu *crf.* Mutacja w genie *rrn* kodującym 23S rRNA w podjednostce 50S rybosomu powoduje modyfikację miejsca docelowego dla linezolidu w obrębie domeny V 23S rRNA i uniemożliwia działanie linezolidu. Wśród szczepów izolowanych z przypadków klinicznych, największe znaczenie wydaje się mieć mutacja G2576U (G2576T w rDNA). Mutacja ta została stwierdzona u kilku opornych szczepów *Enterococcus* oraz w pojedynczych szczepach *S. aureus*, *S. epidermidis* oraz *S. oralis* [29]. W jednym szczepie *S. aureus* opornym na linezolid stwierdzono obecność innej mutacji, mianowicie T2500A, przy braku G2576U [12]. Stwierdzono, że w przypadku 4 opornych klinicznych izolatów *S. aureus*, charakteryzujących się wartościami MIC linezolidu 16 mg/L (3 szczepy) i 8 mg/L (1 szczep), mutacja G2576T występowała zawsze w dwóch allelach na pięć, przy czym zawsze była obecna w kopii 5 (*rrn5*) [12].

Drugi mechanizm polega na syntezie metylotransferazy Cfr powodującej metylację 23SrRNA w pozycji A2503. Gen *cfr* znaleziono w plazmidzie p004-737X (*istAS-istBS-cfr*-D*tnp)* o wielkości 55 kb. Ekspresja genu *cfr* powoduje oporność na linezolid, linkozamidy, fenikole (chloramfenikol), streptograminy A i retapamulin [13].

10. Oporność na glikopeptydy

Kryterium oporności: MIC wankomycyny ≥16 mg/L a MIC teikoplaniny ≥32 mg/L [21]. Pojedyncze szczepy VRSA opisano w ostatnich latach w USA i Azji [25, 30]. Szczepy VRSA nabyły geny oporności na wankomycynę typu *vanA* od enterokoków. Jak dotąd opisano siedem takich szczepów w USA. Pierwsze dwa szczepy opisano w 2002 roku, u obu stwierdzono obecność Tn*1546*, elementu noszącego operon *vanA* [16]. Pierwszy z wyizolowanych szczepów, szczep Michigan (MI-VRSA) wykazywał oporność na wysokie stężenia wankomycyny i teikoplaniny, natomiast drugi, pochodzący z Pensylwanii (PE-VRSA) wykazywał oporność tylko na wankomycynę. Okazało się, że geny warunkujące oporność na wankomycynę u szczepu MI-VRSA wykazują znaczną stabilność, podczas gdy w przypadku szczepu PE-VRSA są bardzo łatwo tracone [24]. Szczep MI-VRSA ma plazmid o wielkości 57,9 kb, który powstał z plazmidu podobnego do pSK41, z insercją Tn1546-like [16, 30]. W 2004 roku wyizolowano w Nowym Jorku szczep, który charakteryzuje się najniższą opornością. Szczepy tego typu, przy zastosowaniu rutynowych metod badania wrażliwości na antybiotyki, mogą zostać łatwo przeoczone [1]. Stwierdzono, że wszystkie szczepy VRSA należały do wspólnego kompleksu klonalnego ST5. Ponadto, u wszystkich VRSA stwierdzono mutację w genie hsdR, kodującym Sau1 (1 system modyfikacyjno-restrykcyjny) [30]. U kilku szczepów *S. aureus*, u których stwierdzono obecność genu *vanA* (niezależnie od jego ekspresji) wykryto obecność innych genów oporności: *ermB-aadE-sat4-aphA-3*, *msrA, aac(6')-aph(2")-Ia*

oraz *tet(S)* i *tet(U)*, pochodzących prawdopodobnie od *Enterococcus faecium* [28].

Poza szczepami VRSA (GISA) wyszczególnia się szczepy VISA (MIC wankomycyny 4–8 mg/L), hVISA (heterogenne VISA) oraz VTSA (vancomycin tolerance *S. aureus*, MBC wankomycyny ≥32 MIC). Zmniejszona wrażliwość na wankomycynę wynika prawdopodobnie z różnych reorganizacji genomu [10, 20].

11. Oporność na mupirocynę

Przyczyną oporności na mupirocynę jest produkcja kodowanej przez występujący w plazmidach (np. pGO400, pJ2947, pUSA03) gen *ileS* syntetazy izoleucylo-t-RNA niewrażliwej na mupirocynę lub o zmniejszonym powinowactwie do mupirocyny (mutacje w genie chromosomalnym). Oporność kodowana przez plazmidy warunkuje zwykle MIC > 500 mg/L. [5, 11, 15].

Piśmiennictwo

1. Centers for Disease Control and Prevention Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – New York, 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **53**, 322–323 (2004)
2. Chongtrakool P., Hiramatsu K. i wsp.: Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother*. **50**, 1001–1012 (2006)
3. Colca J.R., Mankin A.S.i wsp.: Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics. *J. Biol. Chem*. **278**, 21972–21979 (2003) (cytowana praca jest dziełem 16 autorów)
4. Cookson B.D., Enright M.C. i wsp.: Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J. Clin. Microbiol*. **45**, 1830–1837 (2007) (cytowana praca jest dziełem 30 autorów)
5. 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**(9512), 731–739 (2006) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
6. Haroche J., Morvan A., Davi M., Allignet J., Bimet F., El Solh N.: Clonal diversity among streptogramin A-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in French hospitals. *J. Clin. Microbiol*. **41**, 586–91 (2003)
7. Ida T., Okamoto R., Nonoyama M., Irinoda K., Kurazono M., Inoue M.: Antagonism between aminoglycosides and β-lactams in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate involves induction of an aminoglycoside-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother*. **46**,1516–1521 (2002)
8. Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K.: Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**, 2637–2651 (2004)
9. Ito T., Okuma K., Ma X.X., Yuzawa H., Hiramatsu K.: Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Res. Updates*, **6**, 41–52 (2003)
10. Jansen A., Türck M., Szekat C., Nagel M., Clever I., Bierbaum G.: Role of insertion elements and yycFG in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol*. **297**, 205–215 (2007)
11. Lowy D.: Antimicrobial resistance: the example of *S. aureus*. *Sci. Med*. **111**, 1256–1273 (2003)
12. Meka V.G., Pillai S.K., Sakoulas G., Wennersten C., Venkataraman L., DeGirolami P.C., Eliopoulos G.M., Moellering R.C. Jr., Gold H.S.: Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J. Infect. Dis*. **190**, 311–317 (2004)
13. Mendes R.E., Deshpande L.M., Castanheira M., Dipersio J., Saubolle M., Jones R.N.: First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother*. w druku (2008)
14. Milheiriço C., Oliveira D.C., de Lencastre H.: Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. *J. Antimicrob. Chemother*. **60**, 42–48 (2007)
15. Młynarczyk A., Młynarczyk G., Łuczak M.: Mechanizmy oporności na antybiotyki szczepów MRSA. *Zakażenia*, **6**, 26–30 (2004)
16. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Łuczak M.: Oporność na antybiotyki glikopeptydowe u ziarenkowców Gram(+). *Zakażenia*, **1**, 27–32 (2005)
17. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Szymanek K., Bilewska A., Łuczak M. Korelacja genotypów i fenotypów oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B u *Staphylococcus aureus*. *Med. Dośw. Mikrobiol*. **59**, 17–25 (2007)
18. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Szymanek K., Bilewska A., Pupek J., Łuczak M. Aktywność chinupristiny/dalfopristiny wobec erytromycyno-opornych szczepów MRSA izolowanych z materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **58**, 199–205 (2006)
19. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Szymanek K., Łuczak M.: Częstość występowania genów *ermA, ermB, ermC* i *msrA*/*B* u metycylino-opornych klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na erytromycynę izolowanych w Polsce. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **58**, 183–190 (2006)
20. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Żabicka D., Jeljaszewicz J.: Lysogenic conversion as a factor influencing the vancomycin tolerance phenomenon in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother*. **40**, 136–137 (1997)
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard M7-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2006
22. Oliveira D.C., Milheiriço C., de Lencastre H:. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3457–3459 (2006)
23. Oliveira D.C., Milheiriço C., Vinga S., de Lencastre H.: Assessment of allelic variation in the *ccrAB* locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 23–30 (2006)

24. Perichon B., Courvalin P.: Heterologous expression of the enterococcal vanA operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**, 4281–4285 (2004)
25. Saha B., Singh A.K., Ghosh A., Bal M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *J. Med. Microbiol.* **57**, 72–79 (2008)
26. Shore A., Rossney A.S., Keane C.T., Enright M.C., Coleman D.C.: Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob. Agents Chemother*. **49**, 2070–2083 (2005)
27. Steward C.D., Raney P.M., Morrell A.K., Williams P.P., McDougal L.K., Jevitt L., McGowan J.E. Jr, Tenover F.C.: Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol*. **43**, 1716–1721 (2005)
28. Weigel L.M., Patel J.B. i wsp.: High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 231–238 (2007) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
29. Woodford N.: Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clin. Microbiol. Infect*. **11**, 2–21 (2005)
30. Zhu W., Clark N.C., McDougal L.K., Hageman J., McDonald L.C., Patel J.B.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan. *Antimicrob. Agents Chemother*. **52**, 452–457 (2008)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 431–434
http://www.pm.microbiology.pl

PROJEKTOWANIE PROBIOTYKÓW DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Piotr B. Heczko*, Magdalena Strus, Piotr Kochan

Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
ul. Czysta 18, 31-121 Kraków, tel. (12) 633 25 67
* Autor korespondencyjny: e-mail: mbheczko@cyf-kr.edu.pl

1. Obecne i przyszłe zastosowania probiotyków. 2. Znane mechanizmy działania probiotyków na organizm gospodarza. 3. Mechanizmy działania probiotyków będące przedmiotem aktualnych badań. 4. Podsumowanie

Designing probiotics for medical applications

Abstract: Despite the development and introduction of certain drugs containing probiotic bacteria of proven efficacy in the treatment and prevention of diseases, little is known about their mechanisms of action. Therefore, elucidation of these mechanisms is currently the logical basis for designing new drugs containing probiotics. These drugs will be applied in the treatment of diseases in which these selected probiotics having special properties, night be clinically effective.

1. Present and future applications of probiotics as medicinal products. 2. Known mechanisms of probiotic activity exerted on host organism. 3. Currently studied mechanisms of probiotic activity. 4. Summary

Słowa kluczowe: bakterie probiotyczne, mechanizmy działania, zastosowania medyczne
Key words: probiotic bacteria, mechanisms of action, medical applications

1. Obecne i przyszłe zastosowania probiotyków

Probiotyki są stosowane do leczenia szerokiego zakresu stanów chorobowych u ludzi i zwierząt. Zaproponowano także wiele przyszłych zastosowań, ale dopiero wyniki badań doświadczalnych i klinicznych zadecydują o ich realności (Tabela I). Jednakże zakres wskazań medycznych oparty na dowodach medycznych jest o wiele węższy niż zastosowania, co wskazuje na nadmierny entuzjazm lekarzy lub bezkrytyczne stosowanie probiotyków bez dowodów, pod wpływem reklamy rozpowszechnianej przez nierzetelnych producentów. Ponadto szereg zastosowań, nawet tych opartych na dowodach, wydaje się być raczej dziełem szczęśliwego przypadku lub też bardzo szerokiego zakresu prowadzonych badań klinicznych, a nie konsekwentnego poszukiwania probiotyków o właściwościach wskazujących na potencjalne możliwości wpływania na przyczynę lub przebieg danego schorzenia.

Chociaż badania nad bakteriami spełniającymi kryteria probiotyków trwają od około 15 lat, absolutna większość szczepów, które zostały zbadane, opisane i wdrożone do produkcji leków (produktów leczniczych) należy do kilku gatunków *Lactobacillus*: *rhamnosus*, *casei*, *plantarum i acidophilus* (*sensu lato*), kilku gatunków *Bifidobacterium: bifidum*, *longum*

Tabela I

Obecne i przyszłe zastosowania kliniczne probiotyków oceniane na podstawie poziomu skuteczności, wg Goldina i Gorbacha [3]

Poziom dowodów medycznych	Zakres zastosowań
Silny	Ostre zapalenie żołądka i jelit Biegunka związana z stosowaniem antybiotyków
Średni	Reakcje alergiczne, szczególnie atopowe zapalenie skóry
Obiecujący	Zakażenia dróg oddechowych u dzieci, Próchnica zębów, Eliminacja nosicielstwa nosowego patogenów, Zapobieganie nawrotowemu zapaleniu jelit związanemu z *Clostridium difficile*, Przewlekłe zapalenie jelit
Potencjalne przyszłe zastosowania	Reumatoidalne zapalenie stawów, Zespół drażliwego jelita, Zapobieganie nowotworom, Alkoholowe uszkodzenie wątroby, Cukrzyca, Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi

Tabela II

Probiotyki mające zastosowania medyczne

Schorzenia	Grupy probiotyków
Nietolerancja laktozy	LAB, *Streptococcus salivarius* susp. *thermophilus*
Ostra biegunka	LAB, Bif lub Sbu
Biegunka związana z antybiotykami	LAB lub Sbu
Biegunka podróżnych	LAB lub Sbu
Alergie	LAB
Biegunka powodowana przez *Clostridium difficile*	LAB
Próchnica zębów	LAB
Zaburzenia trawienia u dzieci z mukowiscydozą	LAB
Zakażenia dróg oddechowych u dzieci	LAB
Kolonizacja nosa przez czynniki patogenne	LAB
Przewlekłe zapalenie jelit lub zespół drażliwego jelita	LAB i Bif, Sbu + lek, Sbu samo, LAB sama

Objaśnienia skrótów: LAB – laseczki kwasu mlekowego, Bif – różne gatunki *Bifidobacterium*, Sbu – *Saccharomyces boulardii*

i *infantis* oraz jednego szczepu trudnego do sklasyfikowania grzyba drożdżopodobnego, *Saccharomyces boulardii*. Można także znaleźć pojedyncze szczepy innych gatunków, nawet o pewnym potencjale patogennym, takie jak *Escherichia coli* i *Enterococcus faecium*. Dane na temat bakterii probiotycznych zostały zebrane w Tabeli II.

2. Znane mechanizmy działania probiotyków na organizm gospodarza

W stosunku do szerokości zastosowań, w gruncie rzeczy gruntownie poznano niewiele mechanizmów działania probiotyków. Najwcześniej odkrytym z nich jest zdolność bakterii kwasu mlekowego, przede wszystkim *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* do produkcji enzymu laktazy. Produkty fermentacji mleka, takie jak jogurt, zawierające laktazę mogą w ten sposób poprawiać trawienie u osób z nietolerancją laktozy wynikłą z niedoboru własnej laktazy spowodowanego defektem genetycznym, albo związaną z wiekiem [9].

Stosunkowo dość wcześnie poznano antybakteryjne działanie probiotyków, czyli ich zdolność do hamowania namnażania się innych bakterii i grzybów w warunkach *in vitro*, a także *in vivo* w organizmach zwierząt doświadczalnych [6]. Wydaje się, że na tym mechanizmie opiera się korzystne działanie probiotyków w zapobieganiu biegunce podróżnych [7], a nawet próchnicy zębów [16].

Innym dobrze, choć nie do końca poznanym mechanizmem działania probiotyków, który prawdopodobnie legł u podstaw ich zastosowań w schorzeniach o zapalnym podłożu jest ich działanie przeciwzapalne. W szeregu badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* i *in vivo* na wielu modelach zwierząt doświadczalnych wykazano, że wiele różnych szczepów bakterii probiotycznych powoduje podwyższenie poziomu cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10, jednocześnie powodując obniżenie poziomu cytokin prozapalnych, takich jak np. TNFα i IL-8 [5]. Uważa się, że na tym mechanizmie opiera się korzystne działanie probiotyków na przebieg przewlekłego zapalenia jelit w postaci choroby Leśniowskiego-Crohna lub wrzodziejącego zapalenia jelita [19], na wygaszanie reakcji alergicznych, szczególnie atopowego zapalenia skóry [8], czy nawet na poprawę metabolizmu w cukrzycy, co jak dotąd wykazano tylko u zwierząt doświadczalnych [1].

3. Mechanizmy działania probiotyków będące przedmiotem aktualnych badań

Badania nad mechanizmami działania probiotyków są prowadzone zarówno w tych zakresach, które są przedmiotem praktycznych zastosowań, ale nieznana jest przyczyna prowadząca do efektów klinicznych, jak i w celu znalezienia nowych zastosowań logicznie wynikających z wykrytych mechanizmów uruchamianych przez wybrane szczepy bakterii. Do pierwszej grupy należą poszukiwania nad interakcjami pomiędzy komórkami nabłonka jelita, a bakteriami z rodzaju *Lactobacillus*. Wykazano, że pewne szczepy tych bakterii wpływają na szczelność bariery jelitowej i to dzięki kilku różnym mechanizmom: zwiększaniu produkcji mucyny pokrywającej nabłonek [14], stymulacji komórek nabłonkowych do zwiększonej produkcji białek połączeń ścisłych [13] oraz uruchamianiu syntezy defenzyn [17]. Wiedząc, że nieszczelność bariery jelitowej jest jedną z pośrednich przyczyn prowadzących do pobudzania odczynu zapalnego w trakcie

przewlekłego zapalenia jelit, można wytłumaczyć dlaczego uzyskiwano pozytywne efekty kliniczne u chorych z tą chorobą po podaniu pewnych probiotyków [4], ale także można na podstawie odpowiednich badań *in vitro* wybrać szczepy o najkorzystniejszych cechach pod kątem takich zastosowań.

Niewątpliwie, najszerzej zakrojone i prowadzone badania dotyczą wpływu bakterii probiotycznych na rozwój odporności gospodarza (Tabela III).

Tabela III

Wpływ probiotyków na rozwój odporności

Uogólniona odpowiedź odpornościowa śluzówek
Zrównoważona odpowiedź ze strony komórek pomocniczych T
Ograniczona odpowiedź zapalna
Wieloraka odpowiedź w zakresie IgA

Założeniem do tych badań jest znany fakt, że donoszony noworodek ma potencjalną zdolność do wytworzenia odpowiedniej odporności, jednak aby do tego doszło, tkanka limfatyczna jelita musi być stale stymulowana przez bakterie kolonizujące jelito. Taka stymulacja powoduje rozwój komórek w kepkach Peyera umożliwiajacych kontakt pomiedzy drobnoustrojami a komórkami. Dodatkowo nastepuje aktywacja komórek osiadlych w nabłonku i podścielisku do produkcji cytokin ochronnych, zas komórki krezkowych wezłów chlonnych produkuja polimeryczne IgA. Zatem rola bakterii probiotycznych, w przeciwienstwie do drobnoustrojów patogennych, jest ułatwianie i ukierunkowywanie tych procesów. Kilka z tych mechanizmów budzi dzisiaj szczególne zainteresowanie badaczy.

Prowadzi się w tym zakresie badania nad szczegółowymi mechanizmami powodującymi wygaszanie procesów zapalnych przez probiotyki na drodze regulacji immunologicznej. Okazało się, że szczepy *L. rhamnosus* powodują indukcję znacznych ilości czynnika stymulującego granulocyty (G-CSF) w makrofagach, który powoduje zahamowanie produkcji TNFα indukowanego w tych komórkach przez *E. coli* lub izolowany lipolisacharyd. Proces ten jest pośredniczony przez aktywację kinaz komórkowych [10]. Z kolei szczepy *L. casei*, które wykazują działanie ochronne na doświadczalne reumatoidalne zapalenie stawów u myszy powodują zmniejszenie produkcji cytokin prozapalnych reagujących z kolagenem typu II przez komórki CD4(+) dzięku zahamowaniu translokacji czynnika NFκB do jądra komórkowego [18]. W świetle innych badań można przypisać takie działanie pewnym strukturom obecnym na powierzchni *Lactobacillus*, takim jak egzopolisacharyd i kwasy lipotejchowe [15].

Szczególnym schorzeniem będącym wynikiem zaburzeń mechanizmów odpornościowych w okresie noworodkowym, w którym wykazano skuteczność probiotyków, chociaż nie poznano mechanizmów ich ochronnego działania jest martwicze zapalenie jelit (necrotizing enterocolitis, NEC) [12], najgroźniejsze schorzenie noworodków z bardzo niską masą urodzeniową. Prowadzi się zatem kilka projektów mających na celu ich wyjaśnienie. Wykazano już, że w niedojrzałych enterocytach nie dochodzi do wytwarzania czynnika IκB, inhibitora szlaku Nb w komórkach, co prowadzi do nadmiernej produkcji prozapalnej cytokiny IL-8 i uruchomienia zapalenia jelita [2]. Kontakt niedojrzałych enterocytów z przesączami hodowli bakterii probiotycznych zapobiegających NEC powoduje zwiększoną ekspresję genów związanych z odpornością wrodzoną (receptorów TLR i cząsteczek sygnałowych), a tym samym wyraźne zahamowanie produkcji IL-8, co może być właśnie mechanizmem protekcyjnego działania probiotyków w tym schorzeniu [20].

Zupełnie nowe spojrzenie na możliwości wykorzystania mechanizmów uruchamianych przez probiotyki stwarzają aktualne technologie molekularne, szczególnie mikromacierze DNA. Dzięki takiemu podejściu możliwe jest śledzenie wpływu bakterii probiotycznych na ekspresję pewnych genów komórek nabłonkowych po wzajemnym kontakcie stworzonym przez kolonizację [11]. Takie podejście stwarza nowe szanse na wyjaśnienie kolejnych mechanizmów działania probiotyków.

4. Podsumowanie

Zastosowania probiotyków w medycynie gwałtownie się ostatnio rozszerzają w wyniku badań klinicznych wykazujących ich korzystny wpływ na przebieg choroby. Tym niemniej najczęściej są poparte pojedynczymi doniesieniami, o wiele rzadziej lekarz ma do dyspozycji bardziej obszerne dowody wynikające z badań wieloośrodkowych lub metaanaliz. Najczęściej wyniki obserwacji klinicznych nie są poparte wcześniejszymi badaniami laboratoryjnymi mającymi na celu wybranie takich bakterii probiotycznych, które posiadają mechanizmy umożliwiające im interakcje z patomechanizmami choroby, w której mają być stosowane. Brak również wcześniejszych badań *in vivo*, których celem jest potwierdzenie skutecznego działania na odpowiednim modelu zwierzęcym, jak i, co ważniejsze, udowodnienie braku działań negatywnych wybranego probiotyku. Dlatego też coraz częściej pojawiają się doniesienia o negatywnych skutkach podawania probiotyków, a nawet o poważnych działaniach ubocznych. Zagadnienia bezpieczeństwa probiotyków będą przedmiotem osobnej publikacji w tym zeszycie *Postępów Mikrobiologii.*

Piśmiennictwo

1. Calcinaro F., Dotta F. i wsp.: Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*, **48**, 1565–1575 (2005) (cytowana praca jest dziełem 15 autorów)
2. Claud E.C., Lu L., Anton P.M., Savidge T., Walker W.A., Cherayil B.J.: Developmentally regulated IkappaB expression in intestinal epithelium and susceptibility to flagellin-induced inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7404–7408 (2004)
3. Goldin B.R., Gorbach S.L.: Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 2:S96–S100 (2008)
4. Guslandi M., Mezzi G., Sorghi M., Testoni P.A.: Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* **45**, 1462–1464 (2000)
5. Hart A.L., Lammers K., Brigidi P., Vitali B., Rizzello F., Gionchetti P., Campieri M., Kamm M.A., Knight S.C., Stagg A.J.: Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, **53**, 1602–1609 (2004)
6. Heczko P.B., Strus M., Kochan P.: Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects. *J. Physiol. Pharmacol.* **57**, 5–12 (2006)
7. Hilton E., Kolakowski P., Singer C., Smith M.: Efficacy of *Lactobacillus* GG as a diarrheal preventive in travelers. *J. Travel. Med*. **4**, 41–43 (1997)
8. Isolauri E., Arvola T., Sütas Y., Moilanen E., Salminen S.: Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy*, **30**, 1604–1610 (2000)
9. Kim H.S., Gilliland S.E.: *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *J. Dairy Sci.* **66**, 959–966 (1983)
10. Kim S.O., Sheikh H.I., Ha S.D., Martins A., Reid G.:G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for *Lactobacillus rhamnosus*-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cell Microbiol.* **8**, 1958–1971 (2006)
11. Klaenhammer T.R., Azcarate-Peril M.A., Altermann E., Barrangou R.: Influence of the dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *J. Nutr.* **137**, 748S–750S (2007)
12. Lin H.C., Su B.H., Chen A.C., Lin T.W., Tsai C.H., Yeh T.F., Oh W.: Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*, **115**, 1–4 (2005)
13. Lutgendorff F., Akkermans L.M., Söderholm J.D.: The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr. Mol. Med.* **8**, 282–298 (2008)
14. Mack D.R., Ahrne S., Hyde L., Wei S., Hollingsworth M.A.: Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut*, **52**, 827–833 (2003)
15. Marcinkiewicz J., Ciszek M., Bobek M., Strus M., Heczko P.B., Kurnyta M., Biedroń R.,Chmielarczyk A.: Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *Int. J. Exp. Pathol.* **88**, 155–164 (2007)
16. Näse L., Hatakka K., Savilahti E., Saxelin M., Pönkä A., Poussa T., Korpela R., Meurman J.H.: Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.* **35**, 412–420 (2001)
17. Schlee M., Harder J., Köten B., Stange E.F., Wehkamp J., Fellermann K.: Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin. Exp. Immunol.* **151**, 528–535 (2008)
18. So J.S., Kwon H.K., Lee C.G., Yi H.J., Park J.A., Lim S.Y., Hwang K.C., Jeon Y.H., Im S.H.: Lactobacillus casei suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions. *Mol. Immunol.* **45**, 2690–2699 (2008)
19. Venturi A., Gionchetti P., Rizzello F., Johansson R., Zucconi E., Brigidi P., Matteuzzi D., Campieri M.: Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **13**, 1103–1108 (1999)
20. Walker W.A.: Mechanisms of action of probiotics. *Clin. Infect. Dis.* **46**, S87–S91 (2008)

POST. MIKROBIOL.,
2008, 47, 3, 435–439
http://www.pm.microbiology.pl

BEZPIECZEŃSTWO PROBIOTYKÓW W ZASTOSOWANIACH KLINICZNYCH

Skrót wykładu przedstawionego na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Szczecinie w dniach 4–7 września 2008 r.

Piotr Kochan

Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii, Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, 31-121 Kraków, ul. Czysta 18
tel. (12) 633 25 67, e-mail: pkochan@cm-uj.krakow.pl

1. Wprowadzenie. 2. Bezpieczeństwo probiotyków. 3. Aktualne doniesienia o zakażeniach i działaniach niepożądanych. 4. Wnioski

Safety of probiotics in clinical applications

Abstract: According to FAO/WHO definition, supported in Poland by the local scientific organization i.e. the Polish Society for Probiotics and Prebiotics, probiotics are live microorganisms, which when administered in adequate amount confer a health benefit on the host. In most cases the application of probiotics is not associated with adverse events however, the latest report from a study in Holland shows that safety of probiotics is as important as their efficacy. This paper aims at showing specific situations which were not safe or were associated with the risk of complications. The materials used were the currently available, state of the art literature as well as reports on safety and adverse events from clinical studies. Recent reports on infections with probiotic strains were included in the analyses, especially the PROPATRIA study. The paper concludes that nowadays there are some documented cases in which the use of probiotics is contraindicated. It seems possible that in the future probiotics will be applied only to certain groups, since some strains may be beneficial to some people but harmful to others.

1. Introduction. 2. Safety of probiotics. 3. Current reports on infections and adverse events. 4. Conclusions

Słowa kluczowe: badania, bezpieczeństwo, działania niepożądane, probiotyki
Key words: adverse effects, probiotics, safety, trials

1. Wprowadzenie

Słowo „probiotyk" pochodzi z greki od słów pro – „dla" i bios – „życie". Pionierami w tej dziedzinie badawczej, na początku ubiegłego wieku, byli: M i e c z n i k o w, który w swoich pracach sugerował, że przyjmowanie z pokarmem bakterii o nieznacznym działaniu proteolitycznym, rozkładających cukry i wytwarzających kwas mlekowy, mogłoby spowodować „wszczepienie korzystnych" bakterii do układu pokarmowego, tym samym zastępując bakterie patogenne; T i s s i e r, który u dzieci z biegunką zaobserwował mniejsze liczby dwudzielnych bakterii nazwanych *Bifidobacterium*; S h i r o t a, dzięki któremu w Japonii wprowadzony został w latach trzydziestych napój zawierający bakterie kwasu mlekowego [12, 13, 21]. Jednak dopiero w drugiej połowie dwudziestego wieku zaczęto używać słowa „probiotyki", wtedy określające czynniki produkowane przez drobnoustroje, które promowały wzrost innych gatunków mikroorganizmów [9]. Przełom nastąpił jednak pod koniec XX wieku, kiedy to zaczęto przyglądać się probiotykom uważniej i formułować coraz to aktualniejsze definicje. Przeszukując bazę publikacji PubMed (www.pubmed.com) za pomocą jednego tylko hasła „probiotics" w latach 1950–1990 można znaleźć jedynie 18 publikacji. Od roku 1990 do dziś (tzn. 28 kwietnia 2008 r.) to samo hasło odnajdywane jest aż 4216 razy! Komentarz jest zbyteczny, dziedzina ta rozwija się z dnia na dzień, a ponieważ w dalszym ciągu mechanizmy działania drobnoustrojów probiotycznych nie są poznane, także ich bezpieczeństwo nie może być uznane za 100% pewne.

2. Bezpieczeństwo probiotyków

Zgodnie z przyjętą przez Organizację Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światową Organizację Zdrowia (WHO) w 2001/2002 roku definicją, probiotyki to żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej ilości, wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza [5, 6, 19]. W 2006 roku wzorując się na Międzynarodowym Stowarzyszeniu Naukowym na rzecz Probiotyków i Prebiotyków (ang. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP) w Polsce powstało towarzystwo naukowe dedykowane tej dziedzinie o nazwie Polskie Towarzystwo Probiotyczne i Prebiotyczne. Od początku swojego istnienia promuje ono stanowisko zgodne z zaleceniami FAO/WHO.

Zalecenia WHO/FAO z 2001 oraz 2002 roku zostały w 2006 skompilowane przez te organizacje w całość i wydane w 2007 roku – za ich zgodą – w formie przewodnika przez Polskie Towarzystwo Probiotyczne i Prebiotyczne [19]. W przewodniku poświęcono dużo uwagi bezpieczeństwu drobnoustrojów probiotycznych i nie omieszkano zamieścić doniesień o działaniach niepożądanych dostępnych w literaturze.

Rozważania nad bezpieczeństwem probiotyków powinny obejmować badania *in vitro* oraz *in vivo*. Ponieważ większość bakterii wykazuje oporność na antybiotyki, jedną z podstawowych czynności jest ustalenie profilu oporności probiotyku na środki przeciwdrobnoustrojowe. Jak dotychczas nie ma wystarczających danych i nie jest wiadomo, przy jakich okazjach stwarzałoby to problemy kliniczne. Eksperci są jednak zgodni, że bakterie, które posiadają zdolność transferu genów oporności nie mogą być stosowane w żywności i uważają, że konieczne są dalsze badania mające na celu wyjaśnienie potencjału przekazywania materiału genetycznego innym drobnoustrojom pochodzącym z przewodu pokarmowego lub ze środowiska zewnętrznego [19].

Mając na uwadze bezpieczeństwo probiotyków u ludzi uważa się, iż w przypadku określonego szczepu probiotycznego ryzyko stosowania musi być nieobecne lub niskie wobec znaczących korzyści zdrowotnych. Tym samym ocena bezpieczeństwa wymaga przeprowadzenia przynajmniej niektórych badań *in vivo* nie tylko z udziałem zwierząt, ale także ludzi, a badanie takie powinno uwzględniać kwestie ostatecznego przeznaczenia szczepu probiotycznego. Innymi słowy, badanie bezpieczeństwa musi uwzględniać ostateczną drogę podawania oraz daną grupę pacjentów/konsumentów docelowych [19].

Większość probiotyków na świecie jest sprzedawana jako suplementy diety lub leki, dlatego tak ważne są prace nad ich bezpieczeństwem. Wiele bakterii kwasu mlekowego posiada długą historię stosowania bez ryzyka potwierdzonego u ludzi i często są określane terminem GRAS (ang. generally recognized as safe), tzn. ogólnie uznawane za bezpieczne. Fakt ten nadal pozostaje najlepszym dowodem ich bezpieczeństwa [4, 14, 18, 22]. Dobrym przykładem jest badanie epidemiologiczne przeprowadzone w Finlandii, dotyczące oceny systematycznie pobieranych próbek pod kątem bakteriemii wywołanej bakteriami z rodzaju *Lactobacillus*, które nie wykazało wzrostu zachorowalności ani częstości bakteriemii przy wzmożonym stosowaniu probiotycznych szczepów *Lactobacillus* [17]. Tym niemniej, w niektórych okolicznościach wybrane szczepy drobnoustrojów uznawane za probiotyczne mogą być związane z działaniami niepożądanymi. Ci sami autorzy trzy lata później donoszą o 89 przypadkach bakteriemii wywołanej szczepami *Lactobacillus*, w tym w 11 przypadkami bakteriemii *Lactobacillus rhamnosus* GG [16]. Wiadome jest, że niektóre drobnoustroje należące do bakterii kwasu mlekowego, jak np. enterokoki, mogą posiadać cechy zjadliwości i eksperci uważają, iż nie powinny być probiotykiem do użytku ludzkiego, pomimo iż niektóre szczepy enterokoków posiadają właściwości probiotyczne i mogą nie wykazywać oporności np. na wankomycynę na etapie przygotowania. Jednak ciężar odpowiedzialności spoczywa na producencie i on musi udowodnić, że dany szczep nie może przekazać oporności na antybiotyki lub stać się zjadliwym i wywołać zakażenie. Istotne jest także, aby każda bakteria kandydująca do miana probiotyku została przebadana indywidualnie, nie można ekstrapolować działania jednego gatunku na inny [19].

Badania nad zastosowaniem probiotyków, oprócz zastosowań w przemyśle spożywczym, są także prowadzone w wielu dziedzinach medycyny. Warto, między innymi, wymienić tutaj badania nad zastosowaniem probiotyków w pediatrii i neonatologii, gdzie badacze weryfikują działanie probiotyków w leczeniu biegunek i NEC, w ginekologii, gdzie skupiają się na utrzymaniu w równowadze mikroflory i leczeniu schorzeń zapalnych pochwy oraz w gastroenterologii, w leczeniu biegunek poantybiotykowych, zaparć i potencjalnie w profilaktyce nowotworów jelita grubego. Ze względu na fakt, iż probiotyki są stosowane na szeroką skalę w żywności (jako suplementy diety) oraz jako leki, dotychczas były uważane za bezpieczne. Dopiero w nowym milenium zaczęto szczegółowo przyglądać się ich bezpieczeństwu i analizować przypadki działań niepożądanych [3, 5, 6, 19].

Wg zaleceń FAO/WHO probiotyki mogą teoretycznie być odpowiedzialne za cztery typy działań niepożądanych [19]:

1. Zakażenia układowe,
2. Szkodliwą działalność metaboliczną,
3. Nadmierną stymulację układu odpornościowego u podatnych jednostek,
4. Transfer genów.

Parametry, jakie należy mieć na uwadze oceniając bezpieczeństwo drobnoustrojów to patogenność, zakaźność i zjadliwość, włączając produkcję toksyn, aktywność metaboliczną oraz inherentne cechy bakterii [4]. Podsumowując, badania zalecane przez FAO/WHO pod kątem bezpieczeństwa probiotyków obejmują: a) określenie schematów oporności antybiotykowej; b) określenie wybranych procesów metabolicznych (np. wytwarzanie D-mleczanów, dekoniugacja soli kwasów żółciowych); c) ocenę działań niepożądanych podczas badań klinicznych; d) nadzór epidemiologiczny nad zdarzeniami niepożądanymi u konsumentów (po wprowadzeniu na rynek); d) jeśli szczep badany należy do szczepów wytwarzających toksynę działającą na ssaki, musi być przebadany w kierunku wytwarzania tej toksyny (np. wg zaleceń unijnych – EU Scientific Committee on Animal Nutrition); e) jeśli szczep badany należy do szczepów posiadających właściwości hemolityczne, wymagane jest określenie tej aktywności. Ponadto ocena wykazująca niezakaźność i brak działań niepożądanych szczepu probiotycznego, dokonana na zwierzętach z upośledzoną odpornością, podnosi bezpieczeństwo ocenianego probiotyku [19].

3. Aktualne doniesienia o zakażeniach i działaniach niepożądanych

Dokonując przeglądu literatury światowej można zauważyć, iż w ostatnich latach pojawia się wiele artykułów, dotyczących izolowania drobnoustrojów z rodzajów *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* oraz *Bifidobacterium* w wielu różnych zakażeniach. Biorąc pod uwagę fakt, iż wiele z wymienionych gatunków to probiotyki, należy dokładnie przeanalizować dostępne dane dotyczące bezpieczeństwa probiotyków stosowanych komercyjnie oraz w przemyśle [4].

Ostatnie kilka lat przyniosło także nowe dane, dotyczące działań niepożądanych związanych ze stosowaniem probiotyków. Już w 2002 roku w „Wytycznych do oceny probiotyków w żywności", tzn. raporcie Połączonej Grupy Roboczej FAO/WHO wymienia się badania, gdzie stwierdzono udział bakterii wymienionych powyżej, w tym dwa przypadki z udziałem *L. rhamnosus* prawdopodobnie po spożyciu probiotyku, trzynaście przypadków fungemii spowodowanej *Saccharomyces* ze skażonych cewników naczyniowych, trzy doniesienia o zakażeniach wywołanych bakteriami *Bacillus*, związanych ze spożyciem probiotyku, opisujące w szczegółach 7 przypadków bakteriemii, posocznicy oraz zapalenia dróg żółciowych, wywołanych *B. subtilis*, wszystkie u pacjentów ze schorzeniem pierwotnym. Enterokoki pojawiają się jako istotna przyczyna zakażeń szpitalnych z izolatami wykazującymi rosnącą oporność na wankomycynę i przez wielu autorów nie są uważane za probiotyki, podobnie jak paciorkowce. Grupa Robocza FAO/WHO zauważyła, że niektóre gatunki *Enterococcus* przejawiają właściwości probiotyczne i w chwili włączania w skład produktu mogą nie wykazywać oporności na wankomycynę. Odpowiedzialność ciąży jednak na producencie. Musi on zapewnić, że użyty szczep probiotyczny nie stanowi znaczącego ryzyka w odniesieniu do przekazania oporności antybiotykowej lub innych właściwości dotyczących zjadliwości [6].

Nie sposób opisać wszystkich doniesień, których liczba jest ostatnio bardzo duża i jest to materiał co najmniej na rozprawę doktorską, dlatego skoncentruję się na kilku ostatnich, ważnych publikacjach.

Tematyka bezpieczeństwa probiotyków zawsze budziła kontrowersje z wielu powodów. Jednym z nich jest fakt, że jeśli coś, co z założenia i definicji ma przynosić korzyści dla zdrowia powoduje działania niepożądane – wzbudza to niepokój. Tym bardziej, że większość probiotyków to suplementy diety, które nie powinny powodować działań niepożądanych. Ponadto bardzo niechętnie mówi się o działaniach niepożądanych z punktu widzenia marketingowego. Z drugiej jednak strony należy pamiętać, iż jedynie przez poznanie tych działań niepożądanych będziemy w stanie zbadać ich mechanizmy, a co za tym idzie dobierać najbardziej odpowiednie szczepy drobnoustrojów dla poszczególnych zastosowań.

Opisane w literaturze przypadki zakażeń wywołane bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* (w 4 przypadkach na 241 były związane z nadmiernym spożyciem przetworów mlecznych) odnoszą się najczęściej do bakteriemii, infekcyjnego zapalanie wsierdzia oraz zakażeń zlokalizowanych. Pod względem gatunków najczęściej identyfikowano *L. casei* oraz *L. rhamnosus*, w 29% były to zakażenia wieloczynnikowe i dotyczyły pacjentów ze schorzeniem pierwotnym np. nowotworem, cukrzycą lub pacjentów po przeszczepie [24]. W zakażeniach u pacjentów z upośledzoną odpornością istotną rolę mogła odgrywać upośledzona bariera jelitowa i mechanizm translokacji, zakażenia te mogą także być trudne w leczeniu [11, 23]. Ze względu na fakt, iż większość bakterii z rodzaju *Lactobacillus* nie jest patogenna trudno jest ocenić ich cechy inherentne i właściwości szczepo-zależne, które mogą nieść ryzyko dla zdrowia. Niektórzy autorzy badają cechy zjadliwości probiotyków podobnie jak dla patogenów, czyli np. zdolność adherencji do ludzkiego kolagenu typu IV, fibrynogenu lub śluzu jelitowego, hemolizę α lub β, niską indukcję wybuchu tlenowego w mononukleocytach z krwi obwodowej oraz oporność na serologiczne mechanizmy zabijania [24].

Mając na uwadze działania niepożądane, T a y l o r i wsp. [20] na podstawie randomizowanego badania kontrolowanego placebo z podwójnie ślepą próbą na grupie końcowej 178 dzieci donoszą, iż suplementacja probiotykiem w pierwszych 6 miesiącach życia dzieci o wysokim ryzyku wystąpienia atopowego zapalenia skóry nie tylko nie zdołała obniżyć ryzyka wystąpienia choroby, ale wręcz wzmogła uczulenie u tych dzieci. Szczepem stosowanym w tym badaniu był *Lactobacillus acidophilus* (LAVRI-A1) a autorzy sugerują, iż wyniki badania kwestionują stosowanie probiotyków w zapobieganiu alergii. Z kolei w fińskim badaniu z randomizacją i podwójnie ślepa próbą autorstwa K a l l i o m ä k i i wsp. [7] przy użyciu *L. rhamnosus* GG wynik jest pozytywny. Autorzy udowadniają, że szczep ten podawany matkom w ostatnim miesiącu ciąży a potem ich dzieciom przez 6 miesięcy (grupa końcowa 116 dzieci) zmniejsza ryzyko wystąpienia wyprysku w ciągu pierwszych 7 lat życia. Nie potwierdza tego z kolei badanie niemieckie grupy K o p p a i wsp. [8], gdzie suplementacja probiotyku na zasadach opartych o badanie fińskie, również szczepem *Lactobacillus* GG, nie tylko nie obniżyła zachorowalności czy ciężkości przebiegu atopowego zapalenia skóry, ale była związana z nawracającymi epizodami zapalenia oskrzeli ze świszczącym oddechem. Jako konkluzję, badacze nie zalecają stosowania *Lactobacillus* GG w pierwotnym

zapobieganiu tej chorobie. Nie wiadomo, czy różnice wynikają z faktu, iż konieczne są dalsze badania oceniające długo-terminowe działanie probiotyku czy też skuteczność to efekt szczepo-zależny. Natomiast autorzy pracy przeglądowej C o c h r a n e, dotyczącej zapobiegania alergii i nadwrażliwości pokarmowej za pomocą probiotyków, sugerują we wnioskach, iż w dalszym ciągu nie ma wystarczających dowodów, aby zalecać dodawanie probiotyków do pokarmów podawanych dzieciom. Pomimo spadku częstości egzemy, działanie to nie było potwierdzone we wszystkich badaniach [15].

Najbardziej niepokojące okazało się niedawno opublikowane doniesienie z badania holenderskiego PROPATRIA (ang. PRObiotics in PAncreatitis TRIAl). W tym wieloośrodkowym randomizowanym badaniu z podwójnie ślepą próbą i kontrolą placebo, przeprowadzonym na grupie 298 pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki, którego celem było wykazanie mniejszej liczby powikłań przy dojelitowym podawaniu wielogatunkowego preparatu probiotycznego (zawierającego *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* oraz *B. lactis* w dawce 10^{10}) dwa razy dziennie przez 28 dni wykazano, ku zaskoczeniu świata nauki, wyższą śmiertelność w grupie przyjmującej preparat probiotyczny. Po wykluczeniu 2 pacjentów z badania z powodu złego rozpoznania, w grupie probiotycznej znalazły się 152 osoby, a w grupie przyjmującej placebo 144. Grupy były zbliżone pod względem charakterystyki pacjentów, nasilenia objawów i przebiegu choroby. Do powikłań zakaźnych doszło u 30% pacjentów w grupie probiotycznej i 28% w grupie placebo. Istotna różnica dotyczyła śmiertelności – w grupie przyjmującej probiotyki zmarły 24 osoby (16%) wobec 9 osób (6%) w grupie placebo. U dziewięciu pacjentów przyjmujących probiotyki doszło do niedotlenienia jelit (8 zmarło), w grupie placebo takie powikłanie nie miało miejsca ($p = 0{,}004$). Można tylko domyślać się mechanizmów, które doprowadziły do niedotlenienia jelit. Podawanie 10 miliardów bakterii probiotycznych dziennie, łącznie z żywieniem dojelitowym, mogło zwiększyć miejscowe zapotrzebowanie na tlen, pogarszając i tak już niski poziom ukrwienia jelit. Drugim możliwym wytłumaczeniem może być obecność probiotyków, która spowodowała miejscowy stan zapalny na poziomie śluzówki. Wniosek z pracy jest jeden – w przypadku pacjentów z wymienioną powyżej chorobą nie należy stosować profilaktyki probiotycznej [1].

Wnioski

Pomimo, iż ryzyko zakażenia bakteriami kwasu mlekowego, za wyjątkiem enterokoków, oraz innymi gatunkami probiotycznymi jest nadal niskie, a niektórzy autorzy postulują, iż pojawiające się coraz to nowe doniesienia o niebezpieczeństwie są skutkiem coraz częstszych badań w tym kierunku [24]; w opinii autorów należy dokładniej przyjrzeć się stosowaniu probiotyków u pacjentów, szczególnie z ciężkimi schorzeniami pierwotnymi, upośledzeniem odporności, onkologicznych i po przeszczepach, leczonych lekami immunosupresyjnymi. Są to grupy osób, u których najczęściej dochodzi do zakażeń i trudno powiedzieć, czy jest to związane po prostu z drobnoustrojami jako czynnikiem zakaźnym, z którymi nie radził sobie układ odpornościowy, czy też ze źle dobranymi szczepami, powodującymi nie taką reakcję organizmu jakiej spodziewaliśmy się [2]. Czy w niedługim czasie znajdziemy ostrzeżenia producentów, aby nie stosować probiotyków u wyżej wymienionych osób? Czy obok laktobacylemii (ang. lactobacillemia) pojawi się nowe określenie jednostki chorobowej, brzmiące dosyć kontrowersyjnie – „zakażenie probiotyczne”? Czas i dalsze badania pokażą, ale na pewno musimy być przygotowani na coraz więcej tego typu doniesień. Wydaje się też, iż w przyszłości konieczne będzie rozdzielenie zastosowania probiotyków na poszczególne grupy osób, dlatego, że to, co dla jednych może mieć działanie korzystne, dla innych będzie niebezpieczne.

Piśmiennictwo

1. Besselink M.G., Dutch Acute Pancreatitis Study Group i wsp.: Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, **371**, 651–659 (2008)
2. Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., Valtonen V.: Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 775–780 (2003)
3. Deshpande G., Rao S., Patole S.: Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet*, **369**, 1614–1620 (2007)
4. Ishibashi N., Yamazaki S.: Probiotics and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 465S–470S (2001)
5. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina, 1–4 October 2001, s. 1–34
6. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002, s. 1–11
7. Kalliomäki M., Salminen S., Poussa T., Isolauri E.: Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1019–1021 (2007)
8. Kopp M.V., Hennemuth I., Heinzmann A., Urbanek R.: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of Lactobacillus GG supplementation. *Pediatrics*, **121**, e850–e856 (2008)

9. Lilly D.M., Stillwell R.H.: Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, **147**, 747–748 (1965)
10. Liong M.T.: Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutr. Rev.* **66**, 192–202 (2008)
11. MacFie J., O'Boyle C., Mitchell C.J., Buckley P.M., Johnstone D., Sudworth P.: Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut*, **45**, 223–228 (1999)
12. Metchnikoff E., The nature of man. Studies in optimistic philosophy, William Heinemann, Londyn, 1908
13. Metchnikoff E., The prolongation of life. Optimistic studies, William Heinemann, Londyn, 1907
14. Naidu A.S., Bidlack W.R., Clemens R.A.: Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38**, 13–126 (1999)
15. Osborn D.A., Sinn J.K.: Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst. Rev.* **4**, CD006475 (2007)
16. Salminen M.K., Rautelin H., Tynkkynen S., Poussa T., Saxelin M., Valtonen V., Järvinen A.: Lactobacillus bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clin. Infect. Dis.* **42**, e35–e44 (2006)
17. Salminen M.K., Tynkkynen S., Rautelin H., Saxelin M., Vaara M., Ruutu P., Sarna S., Valtonen V., Järvinen A.: Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 1155–1160 (2002)
18. Saxelin M., Chuang N.H., Chassy B., Rautelin H., Mäkelä P.H., Salminen S., Gorbach S.L.: Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989–1992. *Clin. Infect. Dis.* **22**, 564–566 (1996)
19. Światowa Organizacja Zdrowia, Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa. Probiotyki w żywności. Właściwości zdrowotne i żywieniowe oraz wytyczne do ich oceny, red. P. Kochan, Polskie Towarzystwo Probiotyczne i Prebiotyczne, Kraków, 2007
20. Taylor A.L., Dunstan J.A., Prescott S.L.: Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 184–191 (2007)
21. Tissier H.: Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *CR Soc. Biol.* **60**, 359–361 (1906)
22. Tuohy K.M., Probert H.M., S mejkal C.W., Gibson G.R.: Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov. Today*, **8**, 692–700 (2003)
23. Wang X., Andersson R., Soltesz V., Leveau P., Ihse I.: Gut origin sepsis, macrophage function, and oxygen extraction associated with acute pancreatitis in the rat. *World J. Surg.* **20**, 299–307 (1996)
24. Vesterlund S., Vankerckhoven V., Saxelin M., Goossens H., Salminen S., Ouwehand A.C.: Safety assessment of Lactobacillus strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 325–331 (2007)

Spis treści

WYKŁADY PLENARNE:

S. Bielecki, H. Kalinowska – Biotechnologiczne nanomateriały 163
A. Szkaradkiewicz – HIV/AIDS z perspektywy 25 lat badań, stosowanej profilaktyki i terapii 171

WYKŁADY W SESJACH TEMATYCZNYCH:

MIKROBIOLOGIA OGÓLNA

W. Małek, S. Wdowiak-Wróbel, M. Kalita, M. Szlachetka – Dylematy z koncepcją i definicją gatunku bakteryjnego 177
M. Kwinkowski, K. Zawadzki, M. Zarzycki, W. Kaca – Organizacja klasterów genów biosyntezy części rdzeniowej LPS u wybranych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* 183
G. Bugla-Płoskońska – Organizacja struktur zewnętrznych bakterii Gram-ujemnych a proces aktywacji układu immunologicznego 191

GENETYKA MOLEKULARNA DROBNOUSTROJÓW

B. Zalewska-Piątek, R. Piątek, J. Kur – Czynniki adhezyjne i inwazyjne uropatogennych szczepów *Escherichia coli* – problematyka infekcji dróg moczowych oraz mechanizmów patogenności 199

MIKROBIOLOGIA GLEBY I ŚRODOWISKA

M.K. Błaszczyk – Gdzie występują psychrofile? 207
M.A. Michałowska, S. Russel – Występowanie i rola myksobakterii w środowisku naturalnym 215
A. Nowak – Metody bioindykacyjne w określaniu wpływu pestycydów na mikroflorę gleby 225

MIKROBIOLOGIA ŻYWNOŚCI, LEKÓW I KOSMETYKÓW

S. Tyski – Mikrobiologiczne bezpieczeństwo leków – harmonizacja wymagań farmakopealnych 235

BIOTECHNOLOGIA PRZEMYSŁOWA

K.W. Szewczyk – Biologiczne wytwarzanie wodoru 241
M. Wanarska, P. Hildebrandt, J. Kur – Drożdżowe systemy ekspresyjne jako narzędzie nowoczesnej mikrobiologii przemysłowej 249

WIRUSY

K. Pyrć – Ludzki koronawirus NL63 – obraz kliniczny i charakterystyka molekularna 257
A. Denys, M. Bigos – Wirusy jako broń biologiczna 263

CHOROBY ODZWIERZĘCE

M. Binek – Interakcje pomiędzy pałeczkami *Salmonella* i komórkami gospodarza, implikacje terapeutyczne 267
E. Podsiadły, S. Tylewska-Wierzbanowska – Występowanie *Bartonella* spp. w wybranych rezerwuarach i wektorach na terenie polski 275
A.J. Furowicz, D. Czernomysy-Furowicz, J. Karakulska, M. Ferlas – Jersinioza zwierząt i człowieka w świetle badań własnych 283
W. Zygner, H. Wędrychowicz – Rola zwierząt jako rezerwuaru giardiozy u ludzi – zoonotyczny potencjał *Giardia intestinalis* 287

ZAKAŻENIA PRZENOSZONE PRZEZ KLESZCZE

W. Zygner, H. Wędrychowicz – Biologia kleszczy właściwych jako wektora chorób zakaźnych i pasożytniczych 293
E. Siński, R. Welc-Falęciak – *Babesia* spp. w Polsce: identyfikacja i epidemiologiczne znaczenie 299
T. Chmielewski, S. Tylewska-Wierzbanowska – Nowe riketsjozy w Europie 307

NOWE I POWRACAJĄCE ZAKAŻENIA

G. Martirosian – *Clostridium difficile*: po 30 latach badań nadal zaskakuje 313
A. Mikucka – *Corynebacterium* spp. – problem nie tylko diagnostyczny 317
K. Pancer, H. Stypułkowska-Misiurewicz – Zagrożenie legionelozą w szpitalach – problem techniczny czy mikrobiologiczny? 325

BAKTERIE OTOCZKOWE

M. Nowosiad, S. Giedrys-Kalemba – Zakażenia *Streptococcus pneumoniae* – aktualne problemy 331

ZAKAŻENIA SZPITALNE

M. Bronk, A. Samet – Szpitalne bakteriemie enterokokowe 339
M. Wróblewska – Znaczenie kliniczne bakterii z rodzaju *Acinetobacter* – nowe zagrożenia ... 345

BIOFILM W MEDYCYNIE I ŚRODOWISKU

E. A. Trafny – Rola biofilmów w patogenezie zakażeń człowieka 353
B. Sadowska, B. Różalska – Biofilm jelitowy – czy można i trzeba integrować w jego skład i funkcjonowanie? 359
E. Gospodarek, P. Zalas – Ingerencja człowieka w komunikowanie się drobnoustrojów 365
B. Różalska, E. Walencka – Alternatywne do antybiotykoterapii sposoby eradykacji biofilmów 371

IMMUNOLOGIA I PATOMECHANIZM ZAKAŻEŃ

W. Rudnicka, K. Rudnicka – 60 lat szczepień BCG. Osiągnięcia, przegrane i nadzieje – nowe szczepionki przeciwgruźlicze w programach klinicznych 379
M. Fol – *Mycobacterium tuberculosis* – jak przetrwać na wrogim terenie? 387
J. Kozieł, A. Maciąg-Gudowska, J. Potempa – *Staphylococcus aureus* jako wewnątrzkomórkowy patogen komórek układu immunologicznego 393
M. Strus, E. Hultgren Hornquist, L. Ohman, P.B. Heczko – Udział bakterii w patomechanizmach przewlekłych zapaleń jelit 401

POSTĘPY W DIAGNOSTYCE ZAKAŻEŃ

B. Kasztelewicz, K. Dzierżanowska-Fangrat – Nowe możliwości wykrywania i monitorowania zakażeń wirusowych 407

ANTYBIOTYKI I OPORNOŚĆ

A. E. Laudy – Systemy MDR – istotny mechanizm oporności pałeczek Gram-ujemnych na antybiotyki i chemioteraputyki 415
A. Młynarczyk, G. Młynarczyk – Molekularne mechanizmy oporności na leki przeciwbakteryjne u *Stahylococcus aureus* 423

FORUM PROBIOTYCZNE

P. B. Heczko, M. Strus, P. Kochan – Projektowanie probiotyków do zastosowań medycznych 431
P. Kochan – Bezpieczeństwo priobiotyków w zastosowaniach klinicznych 435

Contents

S. Bielecki, H. Kalinowska – Biotechnological nanomaterials 163
A. Szkaradkiewicz – HIV/AIDS in the perspective of 25 years of studies, applied prophylaxis and therapy 171
W. Małek, S. Wdowiak-Wróbel, M. Kalita, M. Szlachetka – The dilemma with bacterial species definition and concept 177
M. Kwinkowski, K. Zawadzki, M. Zarzycki, W. Kaca – Genetic organization of the core lipopolysaccharide gene clusters of selected bacteria of the *Enterobacteriaceae* family 183
G. Bugla-Płoskońska – Structure of the Gram-negative bacterial cell wall and the activation of the immune system 191
B. Zalewska-Piątek, R. Piątek, J. Kur – Adhesive and invasive factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains – urinary tract infections and mechanisms of pathogenesis 199
M.K. Błaszczyk – Where can you encounter psychrophiles? 207
M.A. Michałowska, S. Russel – The occurrence and role of myxobacteria in the environment 215
A. Nowak – Bioindication methods in determination of the effect of pesticides on soil microflora 225
S. Tyski – Microbiological safety of medicinal products – harmonization of pharmacopoeial requirements 235
K.W. Szewczyk – Biological production of hydrogen 241
M. Wanarska, P. Hildebrandt, J. Kur – Yeast expression systems as a tool in modern industrial microbiology 249
K. Pyrć – Human Coronavirus NL63 – molecular characteristics and clinical image 257
A. Denys, M. Bigos – Viruses as biological weapons 263
M. Binek – Interactions of *Salmonella* with host cells, therapeutic implications 267
E. Podsiadły, S. Tylewska-Wierzbanowska – Prevalence of *Bartonella* spp. in the reservoir and vectors in Polandi 275
A.J. Furowicz, D. Czernomysy-Furowicz, J. Karakulska, M. Ferlas – Yersiniosis in animals and humans in the light of our own research 283
W. Zygner, H. Wędrychowicz – Role of animals as a reservoir of human giardiasis – zoonotic potential of *Giardia intestinalis* 287
W. Zygner, H. Wędrychowicz – Ixodid ticksas vectors of infectious and parasitic diseases 293
E. Siński, R. Welc-Falęciak – *Babesia* spp. in Poland: the identity and epidemic reality .. 299
T. Chmielewski, S. Tylewska-Wierzbanowska – New rickettsioses in Europe 307
G. Martirosian – *Clostridium difficile:* still surprising after 30 years 313
A. Mikucka – *Corynebacterium* spp. – not only a diagnostics problem 317
K. Pancer, H. Stypułkowska-Misiurewicz – Risk of nosocomial legionellosis – technical or microbiological problem? 325
M. Nowosiad, S. Giedrys-Kalemba – *Streptococcus pneumoniae* infections – current issues 331
M. Bronk, A. Samet – Hospital enterococcal bacteremias 339
M. Wróblewska – Clinical significance of *Acinetobacter* spp. – emerging problems 345
E.A. Trafny – Biofilms and their role in infection pathogenesis 353
B. Sadowska, B. Różalska – Intestinal biofilm – can we and should we interfere in its composition and activity? 359
E. Gospodarek, P. Zalas – Human interference in the communication between microorganisms 365
B. Różalska, E. Walencka – Anti-biofilm therapy – an alternative to antibiotics 371
W. Rudnicka, K. Rudnicka – 60 years of BCG vaccination. Attainments, failures and hopes – new vaccines in clinical trials 379
M. Fol – *Mycobacterium tuberculosis* – how to survive in a hostile environment? 387

J. Kozieł, A. Maciąg-Gudowska, J. Potempa – *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen of immunological cells 393
M. Strus, E. Hultgren Hornquist, L. Ohman, P.B. Heczko – Contribution of bacteria to the pathomechanisms of chronic inflammatory bowel disease 401
B. Kasztelewicz, K. Dzierżanowska-Fangrat – New methods for detection and monitoring of viral infections 407
A. E. Laudy – MDR efflux pumps – the mechanism of Gram-negative rods resistance to antibiotics 415
A. Młynarczyk, G. Młynarczyk – Molecular mechanisms of resistance to antibacterial drugs in *Stahylococcus aureus* 423
P. B. Heczko, M. Strus, P. Kochan – Designing probiotics for medical applications 431
P. Kochan – Safety of probiotics in clinical applications 435