

Kwartalnik
Tom 48

Zeszyt 1 • 2009

CODEN:
PMKMAV 48 (1)
2009

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 (Warszawski Uniwersytet Medyczny), 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

Punktacja za publikację naukową wg MNiSW
4.0

Index Copernicus ICV = 3,16 (2008)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Na okładce: Konidiofor *Aspergillus* sp. (fot. Jarosław Wiśniewski, Instytut Mikrobiologii UW).

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 10 arkuszy wyd., Papier offser 80 g

Skład i druk:

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

Wspomnienie o profesorze Lesławie Arnoldzie Jakubie Badurze (7.04.1925 – 21.12.2008)

21-go grudnia zmarł prof. zw. dr hab. Lesław Badura. Profesor był naszym najlepszym przyjacielem, wybitnym naukowcem, doradcą i wspaniałym nauczycielem akademickim. Opiekował się młodymi pracownikami naukowymi oraz był wielkim przyjacielem młodzieży i studentów. Był cenionym i szanowanym przez społeczność akademicką pracownikiem naukowym, człowiekiem o wielkiej wiedzy, szlachetności i kulturze osobistej, niezwykle prawym i życzliwym, wielkim autorytetem naukowym i moralnym. Profesor wykształcił kilka pokoleń polskich mikrobiologów oraz nieustrudzenie wprowadzał tę dziedzinę wiedzy na arenę międzynarodową. Aktywnie uczestniczył w organizacji pracy naukowej, był członkiem wielu krajowych i zagranicznych towarzystw, komisji, redakcji i komitetów naukowych. Był twórcą polskiej szkoły w zakresie ekologii i fizjologii drobnoustrojów, ochrony środowiska i ekotoksykologii.

Lesław Arnold, Jakub trojga imion urodził się 7 kwietnia 1925 roku w Trzebini. W latach 1931–1937 uczęszczał do szkoły powszechnej w Trzebini, a w latach 1937–1939, do Państwowego Gimnazjum i Liceum w Chrzanowie. W okresie okupacji pracował (1940–1943), jako technik dentystryczny w Trzebini oraz Sanatorium Przeciwgruźliczym w Bystrej Śląskiej k. Bielska-Białej.

Po wyzwoleniu w latach 1945–1947 kontynuuje naukę, początkowo w gimnazjum ogólnokształcącym dla dorosłych w Bytomiu, następnie po zdaniu małej matury, w liceum dla dorosłych, gdzie uzyskuje świadectwo dojrzałości (1947). Po uzyskaniu matury podejmuje w tym samym roku studia na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu i Politechniki we Wrocławiu. W roku 1950 uzyskuje z wynikiem bardzo dobrym stopień magistra filozofii (20.12.1950) z zakresu biologii ogólnej (grupa fizjologii roślin).

W okresie studiów, pracuje zarobkowo: w latach (1948–1949) uczy matematyki w Niższym Seminarium Duchownym prowadzonym przez O.O. Salezjanów w Dobroszyczach. W roku akademickim 1949/50 otrzymuje stypendium Ministra Oświaty. Tuż przed



ukończeniem studiów podejmuje, pracę na etacie zastępcy asystenta (01.08.1950) w Katedrze Fizjologii Roślin, kierowanej przez jednego z najwybitniejszych mikrobiologów Polski, światowej sławy uczoną prof. zw. dr Helenę Krzemieniewską. Dyrektorem Instytutu Botaniki w skład którego wchodziła Katedra prof. Krzemieniewskiej, był wybitny botanik, współtwórca i pierwszy rektor Uniwersytetu Wrocławskiego, prof. zw. dr hab. Stanisław Kulczyński – wiceprezes PAN. Pod kierunkiem Pani Profesor przygotowuje pracę magisterską na temat „Mikroelementy w życiu roślin”. Po ukończeniu w grudniu 1950 roku studiów, z dyplomem magistra filozofii awansuje na stanowisko asystenta, a od października 1951 roku na stanowisko st. asystenta.

W pierwszych latach pracy prowadził badania nad zjawiskiem ryzosfery. W związku z tym odbywa krótki staż naukowy w Zakładzie Mikrobiologii IUNG w Puławach u prof. zw. dr hab. członka rzeczywistego PAN Jadwigi Ziemięckiej. Nawiązuje także współpracę z jednym z najwybitniejszych polskich mikologów prof. dr hab. Tadeuszem Dominikiem późniejszym recenzentem jego rozprawy habilitacyjnej. W dalszej kolejności z inspiracji prof. Krzemieniewskiej podejmuje badania nad występowaniem grzybów mikroskopijnych w glebach leśnych. Pierwsze prace z tego cyklu wykonane na glebach rezerwatu bukowego w Miskowicach, publikuje wraz z prof. H. Krzemieniewską. Dwie prace ukazują się drukiem w roku 1954 w *Acta*

Soc. Botan. Polon. Prowadzi nadal badania mikologiczne, nad występowaniem grzybów glebowych i ich powiązaniu z szatą roślinną w różnych rezerwatach leśnych. Prowadził także doświadczenia z zakresu fizjologii roślin, ale już pod nowym kierownictwem Katedry prof. dr hab. Stefanem Gumińskim. Między innymi stara się określić wpływ związków próchnicznych na wzrost roślin. Prace z tej dziedziny publikuje wraz z profesorem Gumińskim w latach 1958–1964. W roku 1959 kończy rozprawę na temat „Badania nad mikoflorą ściółki i gleby lasu szpilkowego ze zbocza Raduni”. Praca ta stanowiła podstawę do uzyskania stopnia naukowego dr n. przyrodniczych z zakresu mikrobiologii na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego (17.12.1959). Promotorem przewodu doktorskiego był prof. zw. dr hab. późniejszy członek rzeczywisty PAN Władysław Kunicki-Goldfinger, ówczesny kierownik Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Rozprawa ta została opublikowana w roku 1960 w *Acta Microbiologica Polonica*.

W kilka miesięcy później otrzymuje stypendium naukowe z Ministerstwa Oświaty i Szkolnictwa Wyższego i wyjeżdża na staż naukowy do Włoch (01.03.1960–15.09.1960), gdzie w Instituto et Orto Botanico dell'Universita di Torino, pod kierunkiem prof. dr Beniamino Peyronel'a studiuje mikologię. W ramach studiów kontynuuje badania nad określeniem związku pomiędzy mikoflorą, a szatą roślinną. Wyniki tych badań zawarte w dwóch rozprawach ukazują się drukiem w roku 1963 w czasopiśmie włoskim „*Allionia*” (9: 65–74 i 9: 175–186).

Po powrocie do kraju prowadzi dalsze badania ekologiczno-mikologiczne nad występowaniem określonych grup grzybów w różnych zespołach roślinnych, szuka powiązań między szatą roślinną, zespołami leśnymi, a „zespołami” mikroskopijnych grzybów glebowych. Równocześnie podejmuje badania fizjologiczne nad wyjaśnieniem mechanizmu oddziaływania związków huminowych na drożdże i przebieg ich beztlenowego oddychania.

Całokształt pracy naukowej oraz rozprawa habilitacyjna na temat „O mechanizmie „stymulującego” wpływu humianu sodu na proces fermentacji alkoholowej i rozmnażanie drożdży” zamieszczone w *Acta Soc. Botan. Polon.* stanowiły podstawę do wszczęcia postępowania habilitacyjnego. W roku 1965 po złożeniu przed Radą Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego wymaganego przepisami kolokwium oraz wykładu habilitacyjnego na temat „Fizjologia mikoryzy” uzyskuje (4.11.1965) stopień naukowy docenta nauk przyrodniczych w zakresie fizjologii roślin. Po zatwierdzeniu stopnia naukowego (26.01.1966) przez Komisję Centralną otrzymuje etat docenta w Katedrze Ekologii i Geografii Roślin kierowanej przez prof. dr hab. Stefana Macko (31.05.1966).

W roku 1968 po śmierci prof. S. Macko zostaje powołany na stanowisko kierownika Katedry Ekologii i Geografii Roślin (01.03.1968). Rok później po pewnych reorganizacjach Instytutu Botaniki pełniąc już funkcje kierownika Zakładu Ekologii i Geografii Roślin obejmuje stanowisko dyrektora Instytutu Botaniki i Biochemii, którą to funkcję pełnił do roku 1971. W październiku 1975 r. otrzymuje etat profesora nadzwyczajnego na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach i obejmuje kierownictwo Zakładu Mikrobiologii w Instytucie Biologii Molekularnej, na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŚ. Tytuł naukowy profesora zwyczajnego uzyskał 16.11.1984.

W ramach działalności naukowej w Uniwersytecie Śląskim prowadzi wraz z zespołem badania nad wyjaśnieniem mechanizmów oddziaływań metali ciężkich głównie pochodzących z emisji przemysłowych, na mikroorganizmy glebowe i na pełnione przez nie funkcje. Problematyka badawcza Katedry koncentruje się wokół zagadnień związanych z próbą wyjaśnienia udziału mikroorganizmów w funkcjonowaniu ekosystemów leśnych w regionach uprzemysłowionych. Prace te były zawsze centralnie koordynowane i finansowane przez: 1) Instytut Badawczy Leśnictwa (1973–1975), 2) Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN (1976–1980), 3) Ministerstwo Nauki, Szkolnictwa Wyższego i Techniki w ramach koordynacji problemów mikrobiologicznych przez Uniwersytet Łódzki (1981–1990) oraz 4) Ministerstwo Edukacji Narodowej, w ramach badań statutowych i własnych.

Wyniki badań Katedry były publikowane w czasopismach krajowych i referowane na kongresach ogólnopolskich i europejskich. Wiele wyników badań stanowiło podstawy do uzyskiwania tytułów magistra biologii, łącznie ponad 200. Był promotorem trzynastu prac doktorskich, a pięciu jego wychowanków uzyskało stopień doktora habilitowanego (dr J. Pacha, dr J. Szulicka, dr J. Kozdrój, dr P. Krupa oraz dr Z. Piotrowska-Seget).

W latach 1973–1981 pełnił funkcje kierownika Zakładu Mikrobiologii, a od 1981 r. kierownika Katedry Mikrobiologii. W tym też czasie przyjmuje szereg obowiązków administracyjnych: 1) prodziekana d.s. studenckich (1975–1978), 2) dyrektora Instytutu Biologii Molekularnej (1978–1979), 3) dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŚ (przez dwie kadencje 1984–1990). Aktywnie uczestniczył, w pracach różnych komitetów i komisji naukowych PAN: 1) Komitetu Mikrobiologii (od roku 1975–1989), 2) Komitetu Gleboznawstwa i Chemii Rolnej (1987–1989, 1993–1996), 3) Komitetu Naukowego d.s. Badań Nad Globalnymi Zmianami Przyrodniczego Środowiska przy Prezydium PAN (1987–1990), 4) Komitetu Inżynierii Środowiska (1991–1993), 5) Komisji Ochrony Środowiska i Utylizacji Odpadów przy Od-

dziale Katowickim PAN (od roku 1975), przez dwie kadencje przewodniczył tej Komisji (1988–1999). W latach 1981–1985 był członkiem Zespołu Koordynacyjnego Problemu Międzyresortowego MR.II.17, I stopnia „Aktywność drobnoustrojów oraz ich wykorzystywanie i zwalczanie”, oraz Zespołu koordynacyjnego stopnia II IPIŚ PAN, grupy tematycznej 02 „Ochrona Powietrza i Wód”.

Uczestniczył w obradach kilku Rad Wydawniczych: 1) Rady Wydawniczej miesięcznika *Aura* (od 1988 do chwili śmierci), 2) przewodniczy kolegium redakcyjnemu „Fundacji Ekologicznej *Silesia*” (1991–1998), 3) był członkiem Komitetu Redakcyjnego Biuletynu Komitetu Inżynierii Środowiska PAN (1891–1993). 4) W roku 1996 został powołany na członka Rady Naukowej Instytutu Ekologii PAN w Dziekanowie koło Warszawy (1996–1998) oraz ponownie wybrany na lata 1999–2002. Nadto w latach 1984–1990 brał udział w pracach Komisji Nagród Ministra Edukacji Narodowej. Od roku 2003 był członkiem Społecznego Komitetu Budowy Pomnika gen. Jerzego Ziętka. W okresie III kadencji Sejmu RP był także doradcą do spraw ochrony środowiska przy Komisji Sejmowej Ochrony Środowiska i Zasobów Naturalnych. Był także organizatorem i współorganizatorem kilku międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych. W latach 1996–1997, 1997–1998 oraz od roku 1999 do 2005 był członkiem Komitetu Naukowego Krajowego Kongresu Ekologicznego „Eko-Med” w Tarnowie.

Od wielu lat był członkiem licznych towarzystw naukowych w kraju i zagranicą: 1) Polskiego Towarzystwa Botanicznego (od 1950 r.), 2) Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego (od 1953 r.), 3) Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (od 1959 r.), 4) Polskiego Towarzystwa Gleboznawstwa (od 1967 r.) z ramienia Zarządu Głównego pełnił funkcję (do 1996) przewodniczącego Komisji Biologii Gleby, 5) Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. Kopernika (od 1983 r.), 6) członkiem stałym Europejskiej Akademii na Śląsku i pełnił obowiązki wiceprzewodniczącego (1991–1997), a od 1997 był członkiem zarządu, 7) członkiem rzeczywistym Górnośląskiego Towarzystwa Przyjaciół Nauki (od 1989), 8) Od 1998 był Honorowym członkiem Towarzystwa na Rzecz Górnośląskiego Ogródu Botanicznego, 9) Od roku 1999 był członkiem Zarządu Fundacji Nagród i Wyróżnień im. Bohaterów Wieży Spadochronowej w Katowicach, 10) Był także członkiem Międzynarodowego Towarzystwa Ekotoksikologicznego „*Secotox*” (International Society of Ecotoxicology and Environmental Safety (od 1991), 11) członkiem międzynarodowego towarzystwa – Society for Research on Environment and Health (1991), 12) 8.02.1994 został powołany na członka korespondenta Europejskiej Akademii Ekologicznej (Europäische Akademie für Umweltfragen) z siedzibą w Tybin-

dze, 13) w grudniu 1995 zostaje zwyczajnym członkiem Nowojorskiej Akademii Nauk (*Active member of New York Academy of Science*).

Za osiągnięcia naukowe i dydaktyczno-organizacyjne był wyróżniany: 1) Indywidualną i zespołową, naukową Nagrodą Ministra II stopnia, 2) wieloma Nagrodami Rektora I i II stopnia. 3) nagrodami pieniężnymi Ministra Edukacji Narodowej (1989, 1990). 4) Za całokształt działalności społecznej „Za szczególne zasługi dla środowiska przyrodniczego w woj. katowickim” otrzymał Nagrodę I stopnia z Fundacji Ekologicznej „*Silesia*” i Trybuny Śląskiej (1994). 5) Był odznaczony Złotym Krzyżem Zasługi (25.09.1973). 6) Krzyżem Kawalerskim (15.09.1977), 7) Został wyróżniony tytułem honorowym Zasłużony Nauczyciel PRL (30. 08. 1989), 8) odznaczony Krzyżem Oficerskim Orderu Odrodzenia Polski (25.09.1995) oraz 9) otrzymał liczne medale tj. Medal Komisji Edukacji Narodowej (23.09.1976), Medal 40-lecia PRL (22.07.1984). Brązowy Medal Za Zasługi dla Obronności Kraju (25.09.1989). Przyznano mu także – Złotą Odznakę ZNP (10.11.1969), Złotą Odznakę Uniwersytetu Wrocławskiego (06.06.1972), Złotą Odznakę Uniwersytetu Śląskiego (22.04.1986). Otrzymywał nadto pamiątkowe medale: „Wyróżniony za Naukę i Pracę Społeczną”, za współorganizację „III Kongresu Uczonych Polskiego Pochodzenia” (16–29.07.1989) oraz Uniwersytetu Śląskiego, 10) w roku 1980 został włączony do Galerii Przewodzących Pracowników i Studentów Uniwersytetu Śląskiego za osiągnięcia naukowo-dydaktyczne, 11) W roku 1998 otrzymał Dyplom Honorowy z Fundacji Nagród i Wyróżnień im. Bohaterów Wieży Spadochronowej w Katowicach za aktywną działalność oraz został uhonorowany „Brązowym Medalem Bohaterskim Harcerzom”. 12) W roku 1998 otrzymał także Dyplom za aktywny udział w propagacji Górnośląskiego Ogródu Botanicznego. W dniu 08.01.2005 r. z rąk Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie otrzymał zaszczytny tytuł Honorowego Profesora UW-M.

Z dniem 1.10.1995 formalnie, po osiągnięciu 70 lat przeszedł na emeryturę. Jednakże ówczesny Rektor Uniwersytetu Śląskiego prof. zw. dr hab. Maksymilian Pazdan na wniosek Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska przyznaje mu etat kontraktowego profesora zwyczajnego na którym pracował w latach 1995–2002. W roku akademicki 1998/1999 był wykładowcą w Wyższej Szkole Pedagogicznej w Częstochowie. Ponadto prowadził od 2003 r. wykłady z zakresu ekologii mikroorganizmów na międzyuczelnianym studium doktoranckim przy Główny Instytucie Górnictwa w Katowicach. Od roku 2005 prowadził także wykłady z zakresu biologii ogólnej oraz mikrobiologii w Krakowskiej Szkole Wyższej im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego w Krakowie.

W swym bogatym, imponującym i liczącym się dorobku naukowym posiada ogółem opublikowanych ponad 270 publikacji, artykułów i rozpraw. Powyższe prace ukazywały się w języku polskim, niemieckim, włoskim i angielskim w czasopismach naukowych krajowych i zagranicznych o dużym zasięgu międzynarodowym. Przygotował 4 skrypty dla studentów i 20 artykułów okolicznościowych. Opracował wiele ekspertyz dla gospodarki narodowej i raportów z badań węzłowych, własnych i zleczanych przez różne instytucje. Uczestniczył w ponad 200 konferencjach krajowych i zagranicznych, gdzie wygłaszane przez niego referaty cieszyły się zawsze dużą popularnością i wносиły do wiedzy mikrobiologicznych wiele nowości, a podejmowane tematy wywoływały zawsze sporą dyskusję, którą niejednokrotnie sam celowo prowokował i z chęcią podejmował. Był wielokrotnie zapraszany z referatami na liczne krajowe seminaria,

sympozja, zjazdy i konferencje. W okresie pracy na obu uczelniach opracował dziesiątki recenzji i opinii dla: Centralnej Komisji Kwalifikacyjnej (10), Rad Wydziałów i Instytutów PAN (35), Ministerstwa Edukacji Narodowej (40), KBN-u (110), Koordynatorów Problemów Węzłowych i Resortowych (70), Wydawnictw (170) oraz różnych innych.

Posłannictwo uczonego prof. Lesław Badura rozumiał w jak najszerszym słowa tego znaczeniu. Uważał, że naukowiec powinien zajmować się nie tylko pracą badawczą, lecz także organizacją nauki i jej upowszechnianiem. Takie też posłannictwo realizował w całym swoim życiu. Profesor Lesław A.J. Badura pozostanie w naszej pamięci jako wybitny uczonek, wielki pedagog, społecznik, gorący patriota i szlachetny człowiek oraz wspomniały kolega i przyjaciel.

Prof. zw. dr hab. Wiesław Barabasz

Ksenia Szymanek*, Andrzej Młynarczyk, Grażyna Młynarczyk

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w sierpniu 2008 r.

1. Wstęp. 2. Dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału (TCSTS – two component signal transduction system). 2.1. System *agr*. 2.1.1. Organizacja genetyczna systemu *agr*. 2.1.2. Struktura i dojrzewanie cząsteczki autoinduktora AIP. 2.1.3. Aktywacja przekazywania sygnału w TCSTS. 2.1.3.1. Oddziaływanie ligand-sensor w systemie quorum sensing. 2.1.3.2. Aktywacja domeny białka efektora – AgrA. 2.1.4. Region intergeniczny systemu *agr*. 2.1.5. RNA III. 2.1.5.1. Struktura i organizacja. 2.1.5.2. Funkcja. 2.1.6. Regulacja systemu *agr*. 2.1.6.1. Autoregulacja zależna od AgrA. 2.1.6.2. Regulacja zależna od SarA. 2.1.6.3. Regulacja zależna od *rap/traP*. 2.1.7. Zróżnicowanie i znaczenie systemu *agr*. 2.2. Inne systemy TCSTS uczestniczące w regulacji ekspresji genów *S. aureus*. 3. Inne czynniki regulacyjne ekspresji genów *S. aureus*, nie będące TCSTS. 4. Podsumowanie

Regulatory systems of gene expression in *Staphylococcus aureus*

Abstract: *Staphylococcus aureus* is one of the most common human pathogens. The expression of genes in *S. aureus*, including these encoding virulence factors, seems to be dependent on many inner- and extracellular agents (pH, CO₂, cell density, autoinducer concentration, the phase of growth). Each of these signals may activate a distinct cell regulatory system via a different pathway. Up to date many molecular mechanisms engaged in the global regulation of virulence factors have been identified. Sixteen of them, for example: *agrA/C*, *saeS/R*, *arlS/R*, *srrA/B* (*srhS/R*) *lytS/R*, *rap/traP* belong to the two-component signal transduction systems. Each of them consists of a sensor histidine kinase and a response regulator protein. These systems, including quorum sensing systems, are sensitive to environmental signals. The second class of global regulatory systems are proteins belonging to the SarA-family of proteins, which together with other alternative transcriptional factors, such as RNA III, MgrA, Rot, Sigma_B, may determine the virulent phenotype by binding to the promoter regions of regulated genes. Moreover, the mechanisms of bacterial pathogenesis may be modulated in the proteolytic way by ClpP protein and also at the translational level by the antisense mechanism involving RNA III molecules. Thanks to these regulatory mechanisms, bacteria are able to colonize and cause infections almost in every tissue of human body.

1. Introduction. 2. TCSTS – two component signal transduction system. 2.1. *agr* system. 2.1.1. Genetic organization of *agr*. 2.1.2. Structure and maturation of autoinducer peptide (AIP). 2.1.3. Activation of signal transduction in TCSTS. 2.1.3.1. Ligand-sensor interaction in the quorum sensing system. 2.1.3.2. Activation of response regulator domain of AgrA. 2.1.4. Intergenic region of *agr*. 2.1.5. RNA III. 2.1.5.1. Structure and organization. 2.1.5.2. Function. 2.1.6. Regulation of *agr* system. 2.1.6.1. AgrA-dependent autoregulation. 2.1.6.2. SarA-dependent regulation. 2.1.6.3. *rap/traP*-dependent regulation. 2.1.7. Diversity and role of *agr* system. 2.2. Other TCSTS mechanisms of regulation of gene expression in *S. aureus*. 3. Non-TCSTS mechanisms of regulation of gene expression in *S. aureus*. 4. Summary

Słowa kluczowe: *agr*, czynniki wirulencji, dwuskładnikowe systemy regulacyjne, RNA III, *Staphylococcus aureus*

Key-words: *agr*, RNA III, *Staphylococcus aureus*, two component regulatory systems, virulence factors

1. Wstęp

Aktywność różnych genów w komórkach określonego szczepu *Staphylococcus aureus* nie jest jednako- wa i często zależy od warunków środowiskowych. Ich ekspresja podlega najczęściej złożonym procesom regulacyjnym i może przebiegać na różnych poziomach oraz przy wykorzystaniu różnych mechanizmów. Naj- częściej jest ona uzależniona od: i) warunków środowi- ska, takich jak: stężenie tlenu i dwutlenku węgla, pH, ii) gęstości populacji komórek bakteryjnych, iii) fazy wzrostu hodowli oraz iv) zawartości w środowisku ze- wnętrnym tzw. cząsteczek AIP (autoinducing pepti- de). Dotychczas u *S. aureus* zidentyfikowano co naj- mniej kilkanaście różnych systemów regulatorowych,

które można przyporządkować do dwóch grup czynni- ków uczestniczących w globalnej regulacji ekspresji genów, są to: dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału, aktywne również w regulacji quorum sensing (np.: *agrA/C*, *saeS/R*, *srrA/B*, *arlS/R*, *lytS/R*, *rap/traP*) oraz rodzina białek SarA [8, 13]. Białka sensorowe układów dwuskładnikowych umożliwiają rozpozna- wanie czynników pozakomórkowych, podczas gdy regulatory odpowiedzi, w połączeniu z alternatywny- mi czynnikami transkrypcyjnymi (np.: Rot, Sigma_B, MgrA) i rodziną białek SarA (SarA, SarR, SarS, SarT, SarU, SarV, SarX, SarY, SarZ) działają jako efek- tory wewnątrz złożonej sieci regulacyjnej komórki bakteryjnej. Ponadto modyfikacja ekspresji genów może przebiegać na poziomie inicjacji translacji, przy

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego ul. Chałubiń- skiego 5, 02-004 Warszawa, tel.: (22) 628 27 39, e-mail: xenia.szymanek@wum.edu.pl

wykorzystaniu mechanizmu małych antysensownych cząsteczek RNA, RNA III lub na poziomie dojrzałego produktu genu, przy udziale proteaz Clp [8, 61, 66].

2. Dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału (TCSTS – two component signal transduction system)

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne warunkują zdolność drobnoustrojów do odbierania sygnałów ze środowiska zewnętrznego. Są one wysoce konserwatywne wśród organizmów prokariotycznych. W ich skład zawsze wchodzi dwa elementy: białko sensorowe oraz białko regulatorowe (efektorowe). Sensorem jest enzym o aktywności kinazy histydynowej, zlokalizowany w błonie komórkowej. Zawiera on domenę zewnętrzną (N-koniec białka), która odbiera sygnał środowiskowy oraz domenę wewnątrzkomórkową (C-koniec białka), która wykazuje aktywność kinazy histydynowej. Podczas aktywacji, następuje ATP-zależna autofosforylacja substratowa reszty histydynowej, a następnie przeniesienie reszty fosforanowej na białko regulatora. W cząsteczce regulatora odpowiedzi na sygnał, fosforylacji ulega silnie konserwowana, znajdująca się w domenie N-końcowej reszta asparaginianowa. Prowadzi to do aktywacji regulatora oraz zapoczątkowuje

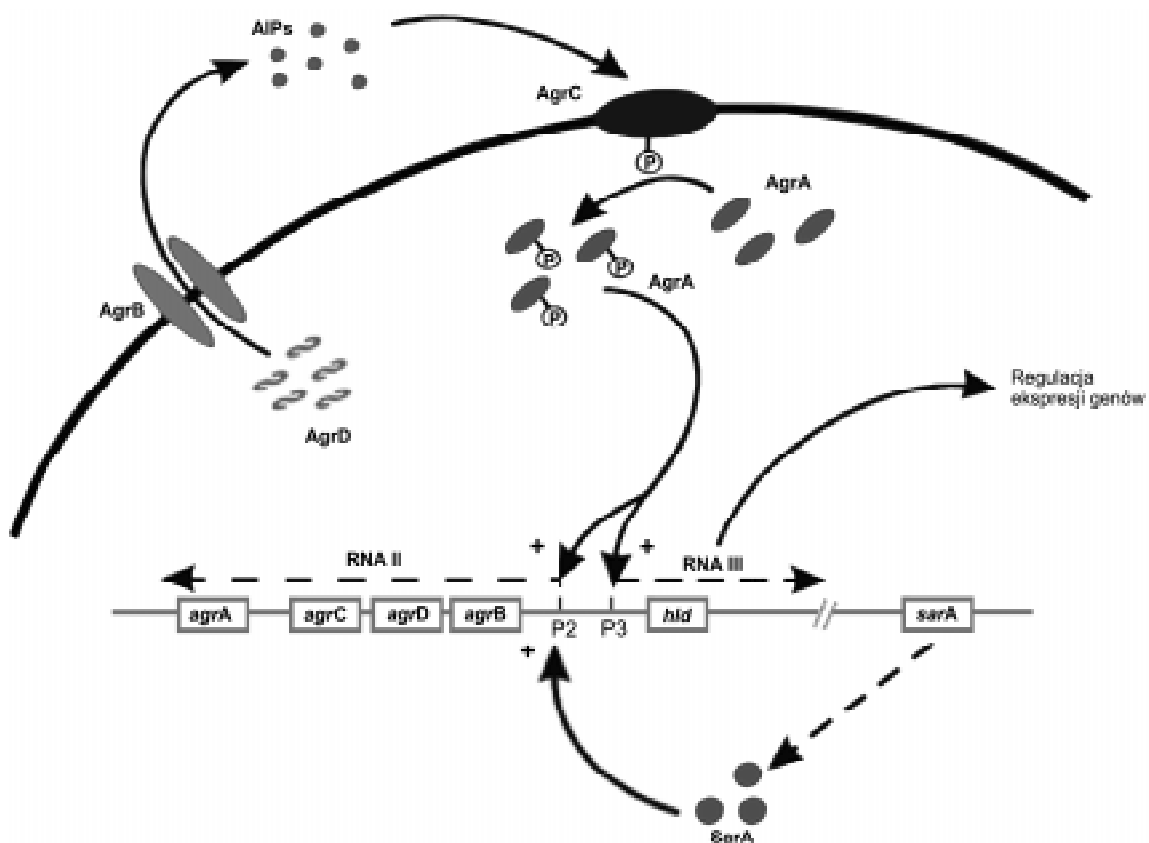
kaskadę zdarzeń, prowadzących do powstania aktywnego czynnika kontrolującego poziom ekspresji różnych genów, najczęściej na poziomie transkrypcji [75]. Funkcje czynników transkrypcyjnych, wiążących DNA poniżej lub powyżej sekwencji promotorowych genów, mogą pełnić różne białka np. w systemie *agr* u *S. aureus* AgrA i/lub kwasy nukleinowe np. RNA III systemu *agr* [36, 43].

U *S. aureus* zostało dotychczas poznanych i opisanych kilka systemów dwuskładnikowych m.in. *agrA/C*, *saeR/S*, *srrA/B*, *arI/R/S*, *lytR/S*, *rap/traP* [3, 9, 27, 29, 47, 76]. Uczestniczą one w globalnych systemach regulacyjnych oraz bezpośrednio w kontroli ekspresji genów kodujących zarówno czynniki wirulencji, białka związane ze strukturami powierzchniowymi komórki bakteryjnej, jak i białka metabolizmu podstawowego. Do tej pory u *S. aureus* najlepiej poznany został system *agr* (accessory gene regulator) [74].

2.1. System *agr*

2.1.1. Organizacja genetyczna systemu *agr*

System *agr* u *S. aureus* jest kodowany przez geny zlokalizowane na chromosomie. Składa się on z fragmentu DNA o wielkości ~3 kpz (Rys. 1), kodującego dwa transkrypty: RNAII i RNAIII, które ulegają transkrypcji z dwóch odrębnych promotorów, odpowiednio



Rys. 1. Schemat organizacji oraz regulacji systemu *agr*

AgrD1 MNTLFNLFDFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVPKELTQLHE
AgrD2 MNTLVNMFDFIILKAKAIGIVGGVNACSSLFDEPKVPAELTNLYDK
AgrD3 MKKLLNKVIELLVDFDNSIGYRAAYINCDFLLDEAENPKELTQLHE
AgrD4 MNTLLNIFDFITGVLKNIGNVASYSTCYFIMDEVEIPKELTQLHE

Rys. 2. Sekwencja aminokwasów propeptydów AgrD u *Staphylococcus aureus* ze wszystkich czterech klas. Podkreśleniem zaznaczono sekwencję peptydów AIP

P2 i P3, o przeciwnie skierowanych orientacjach [74]. Transkrypt RNAII kodują cztery geny: *agrA*, *agrB*, *agrC* i *agrD*. Białka AgrA i AgrC są elementami klasycznego systemu dwuskładnikowego, gdzie AgrC (sensor) stanowi zakotwiczoną w błonie komórkowej, zdolną do autofosforylacji kinazę histydynową, natomiast AgrA (regulator, efektor) pełni funkcję białka odpowiedzi oraz czynnika transkrypcyjnego. AgrD jest propeptydem, wydzielanego na zewnątrz komórki peptydu autoinduktora AIP (autoinducing peptide), zwanego również feromonem, które stanowi swoisty ligand dla białka sensora systemu quorum sensing. Natomiast AgrB jest złożonym białkiem transbłonowym, uczestniczącym w transporcie oraz modyfikacji posttranslacyjnej AgrD [8, 27, 74].

Transkrypt RNAIII koduje gen *hld* hemolizyny δ oraz pełni funkcje regulatorowe w aktywacji i/lub represji ekspresji genów systemu *agr*, a także licznych czynników wirulencji zarówno tych związanych z błoną komórkową, jak i wydzielanych na zewnątrz komórki [6, 69]. Schemat pokazujący całościowo działanie systemu *agr* został przedstawiony na rys. 1.

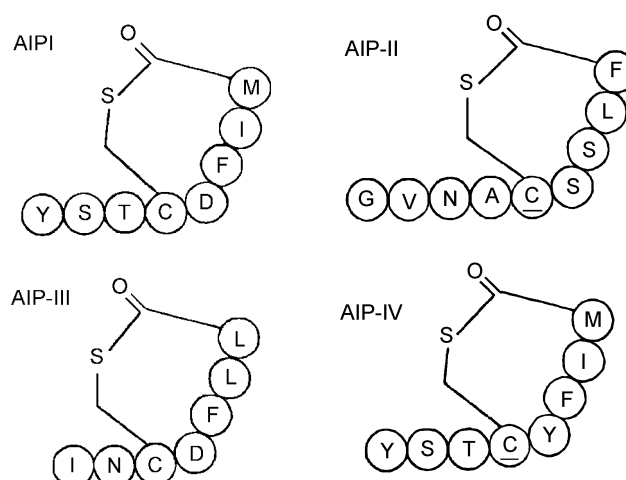
2.1.2. Struktura oraz dojrzewanie cząsteczki autoinduktora AIP

Peptyd AIP gronkowca złocistego jest małą cząsteczką zbudowaną z 7 do 9 aminokwasów, zawierającą w swojej strukturze pięcioczłonowy pierścień laktonowy [41, 54]. W strukturze genu *agrD* obserwuje się występowanie zjawiska polimorfizmu, co przekłada się na znaczne zróżnicowanie struktury I-rzędowej peptydów AgrD oraz AIP. Zróżnicowanie dotyczy również produktów genów *agrB* oraz *agrC*, czyli białek ściśle związanych z modyfikacją, sekrecją AgrD oraz aktywacją sensora AgrC. Na podstawie analizy sekwencji genów *agrB*, *agrC* i *agrD*, wyróżnia się obecnie u *S. aureus*, cztery grupy *agr*, oznaczone jako *agr-I*, *agr-II*, *agr-III* i *agr-IV* [41]. Różnice w sekwencji propeptydów *agrD* (AgrD-I, AgrD-II, AgrD-III i AgrD-IV) oraz peptydów AIP (AIP-I, AIP-II, AIP-III, AIP-IV) u poszczególnych czterech grup *agr* przedstawiono odpowiednio na rys. 2 i 3 [41, 54].

Propeptydy AgrD ze wszystkich czterech grup są niedojrzałymi postaciami odpowiednich peptydów AIP. Każdy z nich zawiera na N-końcu amfoteryczną

strukturę α -helikalną, która umożliwia zakotwiczenie produktu w błonie komórkowej oraz silnie hydrofilną C-końcową domenę, która pozostaje niezakotwiczona w cytoplazmie [99]. Sekwencja autoinduktora znajduje się w środkowej części propeptydu. Może ona zawierać, w zależności od klasy, 7 do 9 aminokwasów. Cechą wspólną dla wszystkich cząsteczek AIP jest obecność reszty cysteiny w piątej pozycji od C-końca [41, 57, 73]. Poza tym jedynie cząsteczki autoinduktora z grupy I i IV mają niemal identyczną strukturę I-rzędową, różniącą się tylko jedną pozycją aminokwasu w pozycji czwartej od C-końca (u AgrD-I – reszta kwasu asparaginowego D, u AgrD-IV – reszta tyrozynowa Y) [54, 60]. W strukturze dojrzałego peptydu jest obecny pierścień laktonowy, zbudowany z pięciu aminokwasów, w którym znajduje się wiązanie tioestrowe, wytworzone między grupami: siarkowodorową silnie konserwowanej reszty cysteinowej, a karboksylową ostatniego aminokwasu na C-końcu peptydu (Rys. 3) [57, 60].

Przekształcenie propeptydu AgrD w dojrzałą cząsteczkę autoinduktora, obejmuje cztery etapy. Są nimi: dwa cięcia proteolityczne, wytworzenie pierścienia laktonowego i transport na zewnątrz komórki. Ważną rolę w modyfikacji posttranslacyjnej AgrD odgrywa struktura α -helikalna. Umożliwia ona zagnieżdżenie propeptydu w błonie komórkowej w pobliżu białka AgrB, które pełni podwójną funkcję: endopeptydazy



Rys. 3. Struktura cząsteczek autoinduktora (AIP) ze wszystkich czterech grup *agr*

cysteinowej oraz transportera w systemie transportu typu ABC (ATP-binding cassette) [99].

AgrB jest białkiem transbłonowym, złożonym z sześciu podjednostek o strukturze α -helikalnej zlokalizowanych w błonie komórkowej, oddzielonych krótkimi pętlami znajdującymi się zarówno po jej stronie zewnętrznej, jak i cytoplazmatycznej. Cztery peryferyczne położone struktury mają właściwości silnie hydrofobowe i najprawdopodobniej uczestniczą w obróbce propeptydu AgrD, natomiast dwie środkowe spirale, o właściwościach hydrofilowych, stanowią potencjalny kanał transportera [81, 97]. Z badań przeprowadzonych w 2004 roku przez Zhang i wsp. wynika, że za przetwarzanie propeptydu AgrD-I jest odpowiedzialny fragment AgrB-I pomiędzy 43 a 67 aminokwasem, natomiast za analogiczną obróbkę AgrD-II, fragment AgrB-II, zawierający aminokwasy w pozycji od 126 do 141. AgrB-I i AgrB-II wykazują 60% homologii i pomimo tego, że regiony pomiędzy 126 a 141 aminokwasem różnią się tylko w czterech pozycjach, analogiczne procesy przeprowadzają z udziałem różnych domen. Dotychczas nie wyjaśniono przyczyn takiego podziału funkcji [98].

W późniejszych badaniach Zhang i wsp. podjęli próbę znalezienia miejsca w strukturze białka AgrB, stanowiącego potencjalne centrum aktywne proteazy [77]. Okazało się, że jedynie reszty dwóch aminokwasów – histydyny w pozycji 77 (H77) i cysteiny (C84), są niezbędne do wytworzenia prawidłowego białka AIP. Ponad to reszty obydwu aminokwasów są zlokalizowane po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej, tuż przy powierzchni, co ułatwia im dostęp do docelowego miejsca działania. Centrum aktywne endopeptydazy rozpoznaje w cząsteczce AgrD silnie konserwowaną sekwencję asparaginian-glutaminian, znajdującą się tuż za sekwencją autoinduktora. Następuje pierwsze cięcie proteolityczne i uwolnienie grupy karboksylowej na C-końcu propeptydu. W tym samym czasie wysoce reaktywna grupa siarkowodorowa reszty cysteinowej C84 dokonuje ataku na resztę SH cysteiny propeptydu, prowadząc do jej aktywacji. Następuje reakcja transestryfikacji i wytworzenie wiązania tioestrowego z grupą karboksylową ostatniego aminokwasu. W ten sposób reszty pięciu aminokwasów zostają zamknięte w pierścieniu laktonowym [77].

Słabiej poznany jest mechanizm modyfikacji posttranslacyjnej N-końca AgrD. Brak jest uniwersalnego motywu tuż przed sekwencją AIP, natomiast konserwowany motyw izoleucyna-glicyna znajduje się w różnej odległości od pierwszego aminokwasu autoinduktora w cząsteczkach AIP-I/IV, AIP-II oraz AIP-III. Wiadomo jednak, że AgrB-I może przeprowadzać prawidłową modyfikację N-końca zarówno AgrD-I, jak i AgrD-III, prowadząc do powstania aktywnych cząsteczek AIP-I i AIP-III [41]. Najprawdopodobniej jest

to proces bardziej skomplikowany i uczestniczą w nim również inne enzymy bądź struktury komórki.

Aktywny transport zmodyfikowanych cząsteczek AgrD przez kanał błonowy białka AgrB jest ostatnim etapem powstawania peptydu AIP [27].

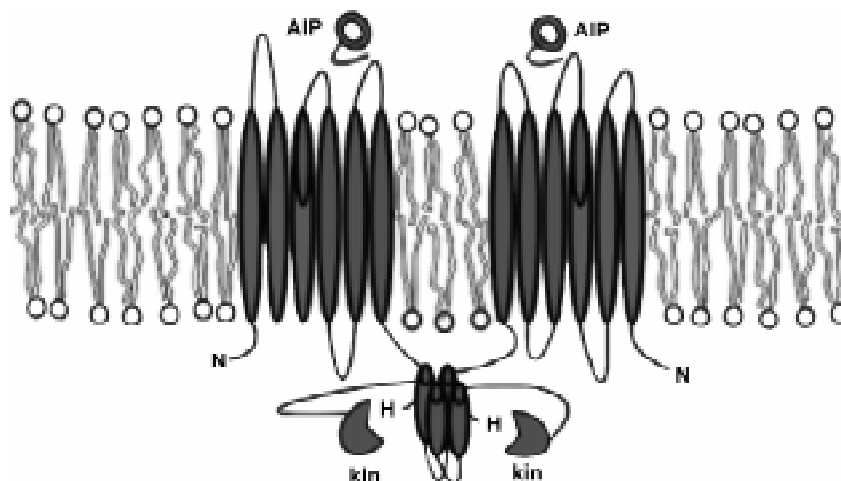
2.1.3. Aktywacja przekazywania sygnału w TCSTS

2.1.3.1. Oddziaływanie ligand-sensor w systemie quorum sensing

Wydzielone na zewnątrz komórki cząsteczki autoinduktora mogą stanowić ligandy dla swoistych receptorów. Jeżeli stężenie AIP w środowisku osiągnie pewną krytyczną wartość, oddziaływanie ligand-receptor staje się na tyle silne by nastąpiła aktywacja sensora [42]. Funkcję sensorową pełni AgrC [48]. Jest to białko o masie cząsteczkowej 46 kDa, o właściwościach kinazy histydynowej I typu (EnvZ-like histidine kinase), pełniące ważną funkcję w procesach komórkowego przekazywania sygnału. Występuje w komórce w postaci homodimeru, zlokalizowanego po części w błonie komórkowej i w cytoplazmie. Składa się z pięciu domen, nazwanych: S (sensor), DHp (dimerization histidine phosphotransfer), CA (catalytic ATP-binding), RR (response regulator) i HPT (histidine-containing phosphotransfer) [17, 48]. Region sensora składa się z dwóch układów domen transbłonowych, z których każda zawiera sześć struktur α -helikalnych. Stanowią one miejsce rozpoznawania i wiązania ligandu. C-końiec domeny S przechodzi w domenę DHp, złożoną z czterech spiral α -helikalnych, zawierających w swojej strukturze dwie cząsteczki silnie konserwowanej histydyny (Rys. 4). Odpowiada ona zarówno za dimeryzację jak i, dzięki obecności pierścienia imidazolowego, przenoszenie grup fosforanowych [17, 48].

Domena DHp jest bezpośrednio połączona ze strukturą CA. Jest to domena silnie konserwowana u *Prokaryota*, zawiera centrum aktywne o właściwościach ATP-azy, dzięki czemu może pełnić funkcję katalityczną w procesie fosforylacji [17, 48].

Oddziaływanie AIP z receptorem jest wysoce specyficzne. Zatem jedynie związanie ligandu z właściwym mu receptorem, czyli AIP-I z AgrC-I, AIP-II z AgrC-II itd., spowoduje aktywację szlaku przekazywania sygnału. Natomiast wiązania niespecyficzne działają antagonistycznie i powodują zablokowanie układu TCSTS [52]. Wydaje się, że cząsteczki autoinduktora mają jednakowe powinowactwo do receptorów każdego typu i ich wiązanie następuje na zasadzie kompetycyjnego wypierania, jednakże analizy ilościowe wykazały, że jest to mechanizm bardziej złożony. Okazuje się, że mechanizm oddziaływania antagonistycznego jest znacznie mniej skomplikowany niż agonistycznego [53]. Przeprowadzone badania dowodzą, że modyfikacja strukturalna w cząsteczce AIP polegająca na zmianie pierścienia tiolaktonowego na laktamowy



Rys. 4. Schemat budowy cząsteczki sensora AgrC

lub laktonowy, powoduje utratę funkcji aktywatora układu dwuskładnikowego, natomiast nie wpływa na zdolność do blokowania układów niespecyficznych [57]. Dotychczas nie został dokładnie wyjaśniony mechanizm wiązania cząsteczek autoinduktora z receptorem. Wiadomo, że w strukturze AIP kluczową rolę odgrywa makropierścień oraz, że jest to oddziaływanie wysoce specyficzne. Zmiana jednego aminokwasu, jak to jest w przypadku cząsteczek AIP-I i AIP-IV, powoduje utratę zdolności do oddziaływania agonistycznego z sensorem. Z kolei doświadczenia, w których badano interakcje AIP-AgrC z wykorzystaniem zmodyfikowanych cząsteczek AIP, zredukowanych do samego pięciocząłowego pierścienia tiolaktonowego wykazały, że makropierścień blokuje aktywację TCS wszystkich czterech typów [53]. Jest on zatem wystarczający do wiązania receptora i inhibicji, ale do aktywacji kinazy histydynowej jest niezbędna również obecność krótkiego ogonka aminokwasowego [57]. Nie wiadomo, które dokładnie aminokwasy odgrywają kluczową rolę w tym procesie oraz czy większe znaczenie ma ich rodzaj, czy lokalizacja. Badania dowodzą bowiem, że dla aktywności AIP-I kluczowe znaczenie ma kwas asparaginowy (D5), zlokalizowany w makropierścieniu, natomiast w przypadku AIP-II jest to asparagina (N3) położona w ogonku autoinduktora [57, 60]. Z kolei wyniki innych eksperymentów pokazują, że ważną rolę mogą odgrywać konserwowane na C-końcu peptydu dwa aminokwasy silnie hydrofobowe: izoleucyna (I), leucyna (L), metionina (M) lub fenyloalanina (F), ponieważ substytucja alaniną F i L w AIP-II spowodowała znaczną redukcję potencjału zarówno agonistycznego, jak i antagonistycznego autoinduktora II typu. Obecność tych hydrofobowych aminokwasów ma wpływ także na sposób wiązania ligandu do receptora. Dowiedziono bowiem, że białka fuzyjne AgrC-I:IV i AgrC-IV:I wiążą preferencyjnie AIP-I

i IV w części dystalnej (bliżej C-końca) domeny sensorowej kinazy [57].

Ponieważ wiązanie ligand-receptor jest wysoce specyficzne, pewne determinanty tej swoistości muszą występować również w strukturze cząsteczki AgrC. Dotychczasowe badania dowodzą, że ważną rolę w rozpoznawaniu i wiązaniu ligandu odgrywa C-końcowa hydrofobowa domena S receptora [94], a dokładnie reszty aminokwasowe zlokalizowane w jej centralnej, zewnątrzkomórkowej pętli [26], bowiem zamiana w strukturze AgrC-IV pięciu aminokwasów w pozycjach 100-F, 101-T, 104-V, 107-V, 116-I na analogiczne, charakterystyczne dla AgrC-I (100-Y, 101-A, 104-T, 107-S, 116-S), spowodowała zmianę specyficzności receptora [26].

Utworzenie specyficznego wiązania pomiędzy AIP, a domeną sensorową odpowiedniego białka AgrC, prowadzi do zmiany konformacji białka, która umożliwia wzajemne zbliżenie się domen DHp i CA oraz przeniesienie grupy fosforanowej z centrum katalitycznego ATP na pierścień imidazolowy histydyny, znajdującej się w rdzeniu domeny dimeryzacyjnej [17]. Następuje auto-trans-fosforylacja reszty histydynowej i tym samym aktywacja kinazy histydynowej. Następnym etapem szlaku przekazywania sygnału w komórce bakterii jest przeniesienie grupy fosforanowej z reszty histydynowej na asparaginową, znajdującą się na N-końcu białka AgrA, co prowadzi do aktywacji białka efektorowego [17, 43, 48].

2.1.3.2. Aktywacja domeny białka efektoru AgrA

Białko AgrA jest drugim kluczowym elementem systemu dwuskładnikowego *agrA/C* i stanowi jego domenę RR (response regulator). AgrA jest białkiem złożonym z 238 aminokwasów, którego sekwencja jest silnie konserwowana wśród szczepów *S. aureus* u wszystkich czterech grup *agr* [65]. Najważniejszymi

Tabela I

Czynniki wirulencji *S. aureus* podlegające *agr*-zależnej pozytywnej oraz negatywnej regulacji [16, 100]

Numer ORF szczepu <i>S. aureus</i> COL	Nazwa genu	Funkcja produktu ekspresji genu
Regulacja pozytywna		
3653	<i>aur</i>	Aureolizyna
396	<i>clfB</i>	Czynnik clumping factor B
583	<i>geh</i>	Lipaza (hydrolaza estrów glicerolowych)
4061	<i>hla</i>	α -toksyna (hemolizyna)
1427	<i>hld</i>	δ -toksyna (hemolizyna)
1928	<i>hlgB</i>	Składnik B γ -toksyny (hemolizyna)
1927	<i>hlgC</i>	Składnik C γ -toksyny (hemolizyna)
667	<i>lip</i>	Lipaza triacyloglicerolowa
1175	<i>pls</i>	Białko powierzchniowe zawierające motyw LPXTG
2036	<i>set8</i>	Egzotoksyna 2
2928	<i>spIA</i>	Proteaza serynowa SplA
2929	<i>spIB</i>	Proteaza serynowa SplB
324	<i>spID</i>	Proteaza serynowa SplD
327	<i>spIF</i>	Proteaza serynowa SplF
2175	<i>sspC</i>	Proteaza
2927	–	Homolog paciorkowcowej adhezyny Emb
1029	–	Homolog białka powierzchniowego Map
4374	–	Białko powierzchniowe Map
5147	–	Homolog paciorkowcowej hemaglutyniny
4523	–	Modulina β 2 rozpuszczalna w fenolu
Regulacja negatywna		
4081	<i>spa</i>	Powierzchniowe białko A
3910	<i>ssaA</i>	Prekursor antygeny sekretoryjnego
1941	–	Antygen miozynowy

elementami strukturalnymi białka są: reszta asparaginowa na N-końcu i sekwencja LytTR na C-końcu. Reszta asparaginowa AgrA jest akceptorem grupy fosforanowej i odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji białka. Natomiast region LytTR jest odpowiedzialny za funkcję efektora [68]. Zawiera w swojej strukturze dwa zasadowe, silnie hydrofilne aminokwasy, o dużym ładunku dodatnim, które nadają dodatni charakter całej domenie C-końcowej. Dzięki tej właściwości wykazuje ona powinowactwo do DNA. Motyw LytTR rozpoznaje i wiąże się do ściśle określonej sekwencji, będącej ciągiem krótkich, niedoskonałych powtórzeń [TA][AC][CA]GTTN[AG][TG], znajdującej się w regionach promotorowych genów, nadając białku AgrA funkcję czynnika transkrypcyjnego [68]. Białko to jest pozytywnym regulatorem ekspresji obydwu transkryptów systemu *agr*, jednak wydajność wiązania do promotora P2 jest wyższa niż do P3 [43]. Wykazano, że AgrA w obecności donorów grup fosforanowych, szczególnie jeżeli są to małe cząsteczki, takie jak fosforan acetylowy, ma tendencję do tworzenia homodimerów, które charakteryzują się większą aktywnością w porównaniu z pojedynczymi cząsteczkami, zwłaszcza do promotora P2 (względem P3) [43]. Ponadto

białko AgrA pośrednio uczestniczy w regulacji transkrypcji innych genów, szczególnie tych związanych z patogennością drobnoustrojów (Tabela I) [16, 100].

2.1.4. Region intergeniczny systemu *agr*

Pomiędzy promotorem P2 i P3 systemu *agr* występuje fragment DNA o długości 120 nukleotydów, który zawiera miejsca wiążące czynniki regulatorowe dla obydwu operonów. Bayer i wsp. dowiedli, że w regionie tym znajduje się 17-nukleotydowa sekwencja zawierająca ciąg kilku krótkich, odwróconych sekwencji powtórzonych, tzw. inverted repeats (IR) [5]. Poza tym w pozycjach -45 od P2 i -66 od P3 znajdują się cztery siedmionukleotydowe sekwencje powtórzone 5'-AGTTAAG-3', z których dwie środkowe obejmują IRs [67]. Wydaje się, że do tych sekwencji mogą przyłączać się czynniki transkrypcyjne, konkurując ze sobą o miejsce wiązania zarówno z P2, jak i P3. Jednak do aktywacji operonu P3 wymagana jest obecność jedynie dwóch, najbliższych położonych sekwencji powtórzonych, co sugeruje możliwość przeprowadzania niezależnej regulacji obydwóch promotorów *agr*. Poza tym w regionie promotorowym P3, pomiędzy nukleotydem -10 a -35 znajduje się 19-nukleotydowy fragment

DNA, odgrywający istotną rolę w aktywacji transkrypcji RNA III. Okazuje się bowiem, że delekcja trzech nukleotydów z tego rejonu objawia się fenotypowo konstytutywną ekspresją operonu P3 [67].

2.1.5. RNA III

2.1.5.1. Struktura i organizacja

Jest to cząsteczka RNA o wielkości 514 par zasad, kodowana przez system *agr* *S. aureus* [69, 74]. Ulega transkrypcji podczas środkowej fazy wzrostu wykładniczego hodowli [4, 92] z promotora P3, który ma orientację przeciwną do promotora P2 [74]. Cząsteczka RNA III przyjmuje skomplikowaną strukturę drugorzędową, w której występują fragmenty niesparowane, jak również sekwencje dwuniciowe [69]. RNA III zawiera 14 struktur typu „szpilka do włosów” (hairpin), z których utworzone są trzy przestrzenne domeny o strukturze α -helisy (A, B i C) oraz 5'-domenę początkową (nukleotydy od 1 – 31) i 3'-domenę końcową (nukleotydy od 383 – 514). Domeny A i B stanowią środkową część cząsteczki (nukleotydy od 32–382), natomiast α -helikalna domena C znajduje się w obrębie domeny 3'-końcowej. Liczne oddziaływania i parowanie nukleotydów między fragmentami początkowymi, a środkowymi i/lub końcowymi cząsteczki (A24-G30/U452-458 α -helisy C) (U32-A42/U371-G382 α -helisy B), stabilizują jej strukturę drugorzędową [69]. Jednocześnie powodują, że helisa C znajduje się w przestrzeni w pobliżu zarówno 3'-, jak i 5'-końca. Występowanie licznych niesparowanych nukleotydów w obrębie helisy C powoduje, że łatwo może dojść do wiązania innych jednoniciowych sekwencji RNA [69].

Każda struktura typu hairpin składa się z ogonka, który stanowią sparowane nukleotydy (podwójna nić) oraz z jednoniciowej pętli na szczycie. W RNA III struktury hairpin 7, 13 i 14 zawierają pętle bogate w nukleotydy cytydynowe, co jest dość nietypowe dla organizmów prokariotycznych, których genom jest bogaty w pary A-T [6]. Zatem wysoce prawdopodobne jest, że sekwencje te mogą pełnić rolę czynników wiążących DNA/RNA. W obrębie helisy B znajdują się szpilki od 2 do 11, natomiast 3'-końcowa domena obejmuje struktury 12, 13 i 14. W zależności od zawartości par A-U i G-C różna jest stabilność tych struktur, jak również ich funkcja [4, 66, 67]. Na przykład bogata w pary G-C struktura 14, jest wysoce stabilna i silnie konserwowana w obrębie rodzaju *Staphylococcus*, sąsiaduje z terminatorem RNA III i wraz z nim pełni funkcję czynnika regulacyjnego [69].

Większość cząsteczki RNA III stanowią sekwencje niekodujące, jednak między 70 a 165 nukleotydem znajduje się sekwencja genu *hld* δ -lizyny. Zawiera ona kodon start AUG i stop UAA translacji oraz sekwencję Shine-Dalgarno (GAA), która stanowi miejsce wiązania rybosomu.

2.1.5.2. Funkcja

Wykazano, że 514-nukleotydowa cząsteczka RNA III pełni plejotropową funkcję. W niewielkiej części (między 70 a 165 nukleotydem) zawiera sekwencję kodującą genu *hld*. Produktem tego genu jest 26 aminokwasowe białko δ -lizyny, posiadające właściwości cytolizyny [38]. Już badania przeprowadzone na początku lat pięćdziesiątych XX wieku wykazały, że gen *hld* jest częścią strukturalną systemu *agr*, jednak ulega transkrypcji z innego promotora (P3) znajdującego się powyżej promotora P2 i podlega pozytywnej regulacji przez system *agr* [37]. Janzon i Arvidson wykazali również rolę RNA III jako czynnika regulacyjnego, ponieważ okazało się, że mutanty pozbawione 3'-końca cząsteczki produkują δ -lizynę z wydajnością 50–75% niższą w porównaniu ze szczepami dzikimi. Dowiedziono również, że mutacja, polegająca na delekcji sekwencji RNA III przez zastąpienie, daje podobny efekt fenotypowy co mutacje w genie *agrA*, czyli powoduje spadek ekspresji genów kodujących egzoproteiny, takie jak hemolizyna α , proteaza serynowa, metaloproteaza i jednocześnie powoduje 10-krotny wzrost ekspresji powierzchniowego białka A [37]. Poznanie struktury drugorzędowej cząsteczki RNA III [69] oraz badania prowadzone w późniejszych latach, pozwoliły na dokładniejsze poznanie mechanizmu jego działania jako regulatora ekspresji genów.

Domena zawierająca 5'-koniec cząsteczki RNA III, odgrywa rolę aktywatora ekspresji genów *hla* i *hly*, kodujących hemolizyny α i β [66, 69]. Morfeldt i wsp. udowodnili, że 5'-koniec cząsteczki RNA III i 5'-koniec cząsteczki genu *hla* wykazują 75% komplementarności oraz, że region między 42 a 72 zasadą RNA III zawiera liczne niesparowane nukleotydy, które mogą stanowić potencjalne miejsce wiązania [66]. Pozwala to przypuszczać o związaniu RNA III z początkowym odcinkiem mRNA-*hla*, co inicjuje zmiany konformacyjne, prowadzące do odsłonięcia miejsca Shine-Dalgarno wiązania rybosomu (RBS) i zainicjowania translacji [66]. Jest to tzw. mechanizm antysensownej regulacji na poziomie transkryptu genu.

Funkcję regulatorową pełni również 3'-koniec RNA III [4, 37]. Jest niezbędny do aktywacji translacji genu *hld* [69] oraz odpowiada za 1-godzinne opóźnienie powstawania produktu tego genu w porównaniu z pojawieniem się transkryptu [4]. Mutanty, zawierające 5'-koniec RNA III (z całą ramką odczytu *hld*, ale bez 3'-końca) połączony z promotorem β -laktamazy, produkują δ -lizynę prawie natychmiast po powstaniu RNA III, w odróżnieniu od mutantów zawierających całą, funkcjonalną cząsteczkę RNA III, u których nadal obserwowano 1-godzinne opóźnienie ekspresji tego enzymu [4]. Przyczyna tego zjawiska nadal nie została wyjaśniona. Wydaje się, że sam 3'-koniec RNA III nie ma bezpośredniego wpływu na inicjację translacji

transkryptu genu δ -lizyny. Prawdopodobnie uczestnicstwo tej domeny w regulacji ekspresji innych genów generuje zmiany konformacyjne *in vivo*, które umożliwiają jednoczesne przyłączenie rybosomu do miejsca inicjacji translacji *hld* lub utworzenie stabilnego kompleksu 16S rRNA/RNAIII/tRNA^{Met}, co prowadzi do 1-godzinnej opóźnienia ekspresji δ -lizyny. Zatem można przypuszczać, że RNA III pełni rolę pośredniego aktywatora translacji *hld*.

Domena 3'-końcowa RNA III uczestniczy również w negatywnej regulacji ekspresji białka powierzchniowego Spa (gen *spa*, staphylococcal protein A). Już badania przeprowadzone w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku dowodzą, że mutanty pozbawione RNA III wykazywały 10-krotny wzrost ekspresji genu *spa* [37], natomiast wprowadzenie do szczepu *S. aureus*, defektywnego w *agr*, operonu P3, podłączonego do promotora *P-bla* objawia się fenotypowo w komórce bakteryjnej spadkiem produkcji proteiny A [69]. Dokładny mechanizm tej regulacji nie został dotychczas poznany, nie wiadomo również czy 3'-domena RNA III reguluje transkrypcję *spa* w sposób pośredni czy bezpośredni.

Poza tym, że RNA III *S. aureus* uczestniczy w regulacji ekspresji genów kodujących różne czynniki wirulencji, może również modulować wyrażanie się genów innych systemów regulacyjnych. Jednym z nich jest system *rot* (repressor of toxins), kodowany przez 498-nukleotydową ramkę odczytu *rot* [59]. Badania porównawcze transkryptomów dowodzą, że Rot jest globalnym regulatorem i może uczestniczyć zarówno w pozytywnej (*spa*, *sarS*, *clfB*, *coa thrB*), jak i negatywnej (*hla*, *hly*, *geh*, *ureA*, *sspA*, *sspB*, *sspC*, *splA*, *splB*, *splC*, *splD*, *splE*, *splF*) regulacji licznych genów [82]. Z kolei cząsteczka RNA III jest aktywatorem ekspresji niektórych toksyn (α -, β - toksyna, geny *hla*, *hly*) i represorem bakteryjnych białek powierzchniowych, takich jak białko A (*spa*), koagulaza (*coa*), czynnik „clumping factor” (*clf*) [18, 58], dlatego można stwierdzić, że RNA III jest bezpośrednim antagonistą białka Rot [71]. Jednakże mechanizm tego antagonizmu może być również pośredni, ponieważ okazuje się, że RNA III wiąże mRNA-*rot*, blokując jego translację i tym samym pośrednio aktywuje transkrypcję genów represjonowanych przez Rot [25]. W mechanizmie tej regulacji uczestniczy 3'-koniec RNA III, a dokładniej struktury „hairpin” 13 i 14. Każda z nich, w pętli, zawiera odcinki bogate w niesparowane nukleotydy cytydynamowe, które są wysoce komplementarne do heksameru w sekwencji Shine-Dalgarno mRNA-*rot* [7]. Zatem RNA III przyłącza się do 5'-końca transkryptu *rot*, co determinuje pojawienie się miejsca rozpoznawalnego dla endorybonukleotydyzy III (RNaza III). Następuje cięcie enzymatyczne w mRNA-*rot*, co prowadzi do jego degradacji [7]. Najprawdopodobniej po-

dobny mechanizm negatywnej regulacji przez RNA III i RNazo-zależnej degradacji dotyczy genu *spa* [36].

2.1.6. Regulacja systemu *agr*

System *agr* *S. aureus* uczestniczy w regulacji ekspresji licznych genów związanych ze strukturami powierzchniowymi, wirulencją i metabolizmem tego gatunku bakterii. Jednakże sam również podlega regulacji przez potencjalnie trzy niezależne mechanizmy: i) mechanizm autoindukcji przez białko AgrA, ii) regulacji zależnej od SarA, iii) system quorum sensing *rap/trpA*.

2.1.6.1. Autoregulacja zależna od AgrA

Białko AgrA jest efekтором systemu quorum sensing *agrA/C* *S. aureus* [65, 74]. Dowiedziono, że aktywne, ufosforylowane białko posiada zdolność do wiązania sekwencji DNA w regionie intergenicznym systemu *agr*, prowadząc do jego aktywacji [43, 67, 68] (Rys. 1, podrozdział 2.1.3.2. oraz 2.1.4.). We wczesnej fazie wzrostu logarytmicznego hodowli bakteryjnej są wytwarzane na pewnym niskim poziomie cząsteczki AgrB i AgrD, co prowadzi do gromadzenia w środowisku feromonów AIP. Kiedy zostanie osiągnięty pewien krytyczny poziom cząsteczek autoinduktora, następuje aktywacja kinazy histydynamowej AgrC, co pociąga za sobą kaskadę zdarzeń prowadzących do fosforylacji AgrA. Białko odpowiedzi wiąże się z regionem znajdującym się powyżej promotora operonu P2 oraz P3, aktywując transkrypcję RNA II i RNA III, a tym samym również genów *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* oraz *hld*.

2.1.6.2. Regulacja zależna od Sar A

Białko SarA po raz pierwszy zostało zidentyfikowane, jako czynnik wiążący DNA w regionie intergenicznym systemu *agr*, w trakcie badań nad mechanizmem regulacji ekspresji RNA III [67]. Jest to 124-amino-kwasowy polipeptyd, zaliczany obecnie do tzw. rodziny białek Sar [5, 12, 13]. Gen kodujący SarA (*sarA*) znajduje się w chromosomie w locus *sar* i stanowi jeden z trzech nakładających się na siebie transkryptów [34]. SarA jest białkiem homodimerycznym, jednodomenowym. Każdy monomer w domenie zawiera pięć struktur o charakterze α -helis, trzy β -kartki oraz kilka pętli między nimi. Tworzą one cząsteczkę, którą można opisać następującym wzorem: $\alpha 1\alpha 2 - \beta 1\alpha 3\alpha 4 - \beta 2\beta 3 - \alpha 5$ [49]. Struktury α -helikalne, jak również β -kartki są silnie konserwowane w rodzinie białek Sar i stanowią potencjalne miejsce wiązania zarówno z większą, jak i mniejszą bruzdą cząsteczki DNA [49]. Ponadto wiadomo, że białka SarA, SarR (homolog SarA), jak również AgrA rozpoznają i współzawodniczą ze sobą o tę samą sekwencję w miejscach promotorowych genów [56, 68, 79]. Dzięki tej właściwości SarA uczestniczy w regulacji transkrypcji genów zarówno w sposób

bezpośredni, jak i pośredni. Może bowiem wiązać regiony promotorowe genów kodujących czynniki wirulencji aktywując (białko wiążące fibrynogen, białko wiążące fibronektynę, enzymy i toksyny) lub hamując (białko A, proteazy) ich transkrypcję. Z kolei oddziaływanie z regionem intergenicznym *agr* (Rys. 1), prowadzi do jego aktywacji i tym samym pośredniej regulacji genów znajdujących się pod kontrolą tego systemu [13]. Ostatnio wykazano, że SarA może również wiązać już zsyntetyzowane cząsteczki mRNA zwiększając ich stabilność i wydłużając czas połowicznego rozpadu, co także może wpływać na fenotypowe podwyższenie poziomu ekspresji regulowanych genów [79].

2.1.6.3. Regulacja zależna od *rap/traP*

System *rap/traP* zaliczany jest, podobnie jak *agr*, do dwuskładnikowych systemów przekazywania sygnału (TCSTS). Zbudowany jest z białka Rap (RNA III activating protein) o masie cząsteczkowej 33 kDa, zwanego również ortologiem rybosomalnego białka L2 [45] oraz białka Trap (target of Rap), o masie cząst. 21 kDa [3]. NH₂-koniec Rap wykazuje wysoki stopień homologii do rybosomalnego białka L2, kodowanego przez gen *rpIB*. Mogą to być nawet te same białka, ale pełniące różne funkcje w zależności od miejsca docelowej lokalizacji. Rap jest 277-aminokwasowym białkiem, wydzielanym na zewnątrz komórki w sposób jeszcze nie do końca poznany [45, 46]. Posiada zdolność indukcji potrójnej fosforylacji białka Trap, które jest unikalne dla *S. aureus*. Trap zbudowane jest ze 167 aminokwasów i wykazuje globularną strukturę α -helisy i β -kartki. W odróżnieniu od receptorów innych systemów quorum sensing nie posiada domeny transbłonowej, co jednak nie wyklucza możliwości pełnienia przez nie funkcji kinazy histydynowej [3]. Zaindukowane Trap ulega potrójnej fosforylacji w pozycjach histydyny His-66, His-79 i His-154, stając się aktywnym czynnikiem transkrypcyjnym [32]. Analiza transkryptomów, szczepów *S. aureus* Trap⁺ i Trap⁻, przy zastosowaniu techniki mikroczipów wykazała, że jest to białko pełniące funkcję globalnego regulatora ekspresji genów [44]. Białko Trap może aktywować geny kodujące liczne czynniki wirulencji: *hla*, *hly*, *hld*, *hlgB* (hemolizyny α , β , δ , γ), *capA*, *capD*, *capF*, *capJ*, *capK*, *capL* (syntetazy polisacharydu otoczkowego), *lip* (prekursora lipazy triacylglicerolowej), *geh* (hydrolazy estrów glicerolowych), *sspA* (gronkowcowej proteazy serynowej), *aur* (prekursora aureolizyny) oraz ich systemy regulacyjne, tj. *agrA-D*; jak również geny metabolizmu podstawowego, takie jak: *arcA* (deaminazy argininowej), *ure* (ureazy), *pyrP* (permeazy uracylowej). Natomiast negatywnej regulacji ulegają przede wszystkim geny kodujące czynniki związane ze strukturami powierzchniowymi komórki bakteryjnej tj.: *sdrC*, *sdrD* (białek wiążących fibrynogen, bogatych

w reszty Ser i Asp), *clfB* (prekursora białka wiążącego fibrynogen), *spa* (prekursora gronkowcowego białka A), ale również geny kodujące adaptatorowe białka odpowiedzi: *groE* (chaperonu 60 kDa), *dnaJ* (białko szoku cieplnego), czy też białka związane z funkcjami komórkowymi np.: *pgk* kinazy fosfoglicerynowej. Dowiedziano, że u *S. aureus* Trap aktywuje transkrypcję 63 genów, natomiast hamuje 15 innych [44]. Wpływ systemu *rap/traP* na ekspresję *agr* udowodniano kilkakrotnie wskazując, że mutanty defektywne w *traP* nie są zdolne do syntezy cząsteczek RNA III i/lub mogą wytwarzać hemolizyny na obniżonym poziomie [3, 32, 44]. Jednak nowsze badania sugerują, że Trap nie odgrywa żadnej roli w regulacji ekspresji systemu *agr*. Okazuje się bowiem, że mutanty *S. aureus* zawierające inaktywowany gen *traP* wykazują aktywność hemolityczną na takim samym poziomie, co szczepy dzikie [1, 87]. Zatem wydaje się, że sprzeczne wyniki dotyczące wpływu systemu *rap/traP* na transkrypcję RNA III wymagają dalszych badań.

System *rap/traP* podlega pozytywnej autoregulacji. Poza tym posiada również mechanizm negatywnej regulacji przeprowadzanej przez białko RIP (RNA III inhibiting protein) [3]. Białko RIP posiada NH₂-koniec (YSPXTNF, gdzie X = reszta cysteinowa lub tryptofanowa) o wysokim stopniu homologii do analogicznej domeny RAP. Pozwala to przypuszczać, że oba białka wiążą się z tą samą sekwencją genu docelowego na zasadzie kompetencyjnego wypierania. Jednakże ten agonistyczno-antagonistyczny mechanizm wykryto dotychczas jedynie u gronkowców koagulazo-ujemnych (*S. xylosum*, *S. warnerii*) [3].

2.1.7. Zróźnicowanie i znaczenie systemu *agr*

System *agr* uczestniczy w globalnej regulacji ekspresji genów związanych z patogennością (Tabela I) oraz metabolizmem podstawowym drobnoustrojów z gatunku *S. aureus* [16]. Ekspresja różnych czynników wirulencji jest uzależniona od zagęszczenia komórek w hodowli oraz fazy wzrostu szczepu bakteryjnego [92]. We wczesnej fazie wzrostu logarytmicznego wytwarzane są przede wszystkim adhezyny i białka związane ze strukturami powierzchniowymi komórki bakteryjnej, takie jak: białko A, białko wiążące kolagen, białko wiążące fibronektynę czy białko wiążące fibrynogen. Warunkują one kolonizację patogenu w odpowiedniej mikroniszy w organizmie gospodarza. Natomiast w późnej fazie wzrostu wykładniczego oraz w fazie stacjonarnej, synteza adhezyn ulega zahamowaniu, z kolei aktywacji ulegają geny kodujące egzotoksyny i enzymy, takie jak toksyny α , β , γ , δ , TSST-1, eksfoliatyny, leukotoksyny, które umożliwiają niszczenie tkanek organizmu gospodarza, rozprzestrzenianie się patogenu do innych narządów oraz mogą być

Tabela II

Charakterystyka systemów regulacji genów u *S. aureus* innych niż *agr* i ich wpływ na ekspresję czynników wirulencji

Nazwa systemu lub czynnika regulacyjnego	Geny strukturalne	Organizacja	Rola w regulacji ekspresji genów czynników wirulencji <i>S. aureus</i> i/lub efekt fenotypowy regulacji		Piśmiennictwo
			Pozytywna	Negatywna	
<i>saeS/R</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> exoproteins regulator)	<i>saeS</i> <i>saeR</i> <i>saeQ</i> <i>saeP</i>	QSS ¹ , regulacja <i>agr</i> -, SarA-zależna, Sigma _B – niezależna	<i>hla</i> , <i>hnb</i> , <i>hld</i> , <i>coa</i> ² , <i>spa</i> , <i>lip</i> ³ , <i>dna</i> ⁴ brak wpływu na <i>agr</i> i <i>sarA</i>	proteazy	[2, 29–31, 89]
<i>arlS/R</i> (autolysis – related locus)	<i>arlS</i> <i>arlR</i>	QSS, regulacja <i>agr</i> -, SarA-, i MgrA-zależna	<i>agr</i> ABCD, <i>arlR</i> , <i>hld</i> , <i>lytS/R</i> , <i>cap5A/5D</i> ⁵ , <i>lrg</i> AB ⁶ , <i>ssaA</i> ⁷ , <i>sdr</i> CDE ⁸ , <i>ssp</i> ⁹ , <i>rot</i> , w sumie 36 genów	<i>hla</i> , <i>hnb</i> , <i>lip</i> ³ , <i>spa</i> , <i>ssp</i> ⁹ , <i>spl</i> ¹⁰ , <i>coa</i> ² , <i>norA</i> ¹¹ , <i>lukE</i> ¹² , <i>cap</i> ⁵ , <i>hlg</i> ¹³ , <i>ebh</i> ¹⁴ , głównie autolizyny i hydrolazy peptydoglikanu, w sumie 78 genów	[19–22, 47, 51]
<i>srrA/B</i> (Staphylococcal respiratory response) lub <i>srhS/R</i>	<i>srrA</i> (<i>srhS</i>), <i>srrB</i> (<i>srhR</i>)	QSS, regulacja w odpowiedzi na stężenie tlenu w środowisku, regulacja <i>agr</i> -zależna	<i>agr</i> , <i>tsst-1</i> ¹⁵ , <i>spa</i> – w warunkach obecności tlenu	<i>agr</i> , <i>tsst-1</i> ¹⁵ , <i>spa</i> – w warunkach beztlenowych	[61, 76, 90, 95]
<i>lytS/R</i>	<i>lytS</i> <i>lytR</i>	QSS	<i>lrg</i> AB ⁶ , wzrost tolerancji szczepów na penicyliny	–	[9, 10, 33, 68]
<i>rap/traP</i> (RNA III activating protein/target of Rap)	<i>rap</i> <i>traP</i>	QSS (Podrozdz. 2.1.6.3.)	potencjalny alternatywny aktywator systemu <i>agr</i>	–	[3, 28, 45, 46, 87]
SarA	<i>sarA</i>	Czynnik transkrypcyjny, białko jednodomenowe, zarówno <i>agr</i> -zależny, jak i <i>agr</i> -niezależny regulator ekspresji genów (Podrozdz. 2.1.6.2.) Rodzina białek Sar, homologi SarA, również działają jako czynniki transkrypcyjne;	<i>sarA</i> , <i>agr</i> , <i>hla</i> , <i>hnb</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i> ¹³ , <i>spa</i> , <i>coa</i> ² , <i>fnb</i> ¹⁶	<i>sarS</i> , <i>sarT</i> , <i>sarV</i>	[5, 8, 12, 3, 34, 49, 55, 56, 79]
SarR	<i>sarR</i>	Białko jednodomenowe	<i>agr</i>	<i>sarA</i>	
SarS	<i>sarS</i> (<i>sarH1</i>)	Białko dwudomenowe	<i>spa</i>	<i>hla</i>	
SarT	<i>sarT</i>	Białko jednodomenowe	<i>sarS</i>	<i>hla</i> , <i>agr</i> , <i>sarU</i>	
SarU	<i>sarU</i>	Białko dwudomenowe	<i>agr</i>	–	
SarV	<i>sarV</i>	Białko jednodomenowe	autoliza	–	
SarX	<i>sarX</i>	Białko jednodomenowe	–	<i>agr</i>	
SarY	<i>sarY</i>	Białko dwudomenowe	nieznana funkcja	nieznana funkcja	
SarZ	<i>sarZ</i>	Homolog białka MarR	<i>hla</i>	–	
MgrA	<i>mgrA</i>	Czynnik transkrypcyjny, należy do białek z rodziny Sar, jest homologiem białka MarR, wykazuje działanie synergistyczne	głównie egzoproteiny, <i>lukDFMS</i> ¹² , <i>set12</i> ¹⁷ , <i>set14</i> ¹⁸ , <i>lip</i> ³ , <i>nuc</i> ¹⁹ , <i>sak</i> ²⁰ , <i>sod</i> ²¹ , <i>cap5A-P</i> ⁵ , <i>sarA</i> , <i>sarX</i> , z systemem <i>agr</i> <i>sigB</i> , <i>lytS</i> , w sumie 175 genów	głównie komórkowe białka związane ze strukturami powierzchniowymi <i>spa</i> , <i>mrp</i> ²² , <i>fib</i> ²³ , <i>isaB</i> ²⁴ , <i>ebh</i> ¹⁴ , <i>hflX</i> ²⁵ , <i>sarV</i> , w sumie 180 genów	[50, 51, 55]
Rot (repressor of toxins)	<i>rot</i>	Czynnik transkrypcyjny, homolog białek z rodziny Sar, białko jednodomenowe, antagonistą <i>agr</i> (Podrozdz. 2.1.5.2.)	<i>spa</i> , <i>sspBC9</i> , w sumie 86 genów	<i>hla</i> , <i>hnb</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i> ¹³ , w sumie 60 genów	[59, 82]
Sigma _B	<i>sigB</i>	Czynnik transkrypcyjny RsbUVW-zależny	<i>coa</i> ² , <i>fnbA</i> ¹⁶ , <i>cap</i> ⁵ , <i>clfA</i> ²⁶ , brak wpływu na <i>sae</i>	<i>hla</i> , <i>spl</i> ¹⁰ , <i>nuc</i> ¹⁹	[8, 31, 100]
ClpX/P	<i>clpX</i> <i>clpP</i>	Aktywność proteolityczna	–	<i>agr</i> , <i>hsr</i> ²⁷ , <i>osr</i> ²⁸ , autoliza, acyldepsiptydy (czynniki antybakteryjne)	[23, 61]

¹) QSS – quorum sensing system²) *coa* – gen kodujący koagulazę³) *lip* – gen kodujący lipazę⁴) *dna* – gen kodujący DNazę (nukleaza DNA)⁵) *cap5A/cap5D* – geny kodujące syntetazy polisacharydu otoczkowego

odpowiedzialne za wystąpienie niektórych objawów chorobowych [18, 24, 58, 72, 78]. System *agr* uczestniczy w regulacji ekspresji genów kodujących te czynniki wirulencji zarówno w sposób bezpośredni (z udziałem RNA III), jak i pośredni (Podrozdział 2.1.3.2. oraz 2.1.6.1.). Jako że białko AgrA jest efektem układu dwuskładnikowego i autoinduktorem całego systemu *agr*, zatem aktywując transkrypcję RNA III, pośrednio reguluje ekspresję genów podlegających RNA III-zależnej regulacji (Podrozdział 2.1.5.2.).

System *agr* występuje u różnych gatunków bakterii w obrębie rodzaju *Staphylococcus* [15]. Nie jest to jednak system jednorodny. Istnieje duże zróżnicowanie genów w obrębie regionu *agrBCD*, co przekłada się na produkty tych genów [41]. Niewielkie różnice w strukturze cząsteczki autoinduktora muszą być skorelowane również ze zmianami w białkach ściśle związanych z obróbką i wydzielaniem AgrD oraz oddziaływaniem dojrzałego AIP, czyli na wysoce swoistych cząsteczkach AgrB oraz AgrC. Wśród 34 gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus*, przy zastosowaniu techniki PCR, zidentyfikowano 24 typy systemu *agr* [15]. Natomiast wśród szczepów tylko *S. aureus*, przy zastosowaniu zestawu czterech par starterów, komplementarnych do regionu hiper-zmiennego w obrębie sekwencji genów *agrB*, *agrC* i *agrD*, wyróżniono cztery grupy *agr* (Podrozdział 2.1.2.) [41]. Oddziaływanie cząsteczek w obrębie grupy jest wysoce specyficzne i aktywacja AgrC może nastąpić praktycznie jedynie przez swoisty autoinduktor grupowy. Jednakże zahamowanie konkretnego systemu może nastąpić przez każdy inny, nieswoisty typ AIP [41, 93]. Naukowcy podejmują liczne próby określenia polimorfizmu i przynależności grupowej szczepów *S. aureus* będących ludzkimi izolatami klinicznymi, podejmują

również próby powiązania występowania typu systemu *agr* z fenotypem, zjadliwością, przynależnością filogenetyczną patogenu lub rodzajem wywoływanej infekcji u ludzi [35, 39, 40, 63, 64, 88, 91, 93, 96]. Wyniki tych badań nie są jednoznaczne, ponieważ w niektórych pracach nie dostrzeżono żadnej z wyżej wymienionych korelacji [63, 88], natomiast w innych zaobserwowano pewne zależności. Dowiedziono, że występowanie szczepów gronkowca złocistego zdolnych do wydzielania toksyny TSST-1, powiązane jest z fenotypem *agr* – grupy III [40, 41]; szczepów posiadających gen *eta* lub *etb*, czyli wytwarzających eksfoliatynę, z grupą *agr-IV* [39, 40], natomiast izolatów produkujących toksynę PVL (Panton-Valentine leukocidin), odpowiedzialnych za ciężkie stany zapalne dolnych dróg oddechowych, z *agr-I* i/lub III grupy [64]. Poza tym stwierdzono, że szczepy *S. aureus* należące do grupy *agr-I* i II częściej są zdolne do wywoływania chorób związanych z wydzielaniem enterotoksyn (*agr-I*) oraz *endocarditis* (*agr-II*) [40]. Z kolei doświadczenia z wykorzystaniem techniki RLFP/*DraI* (restriction fragment length polymorphism) wykazały, że za zakażenia ucha u pacjentów hospitalizowanych w niewielkich koreańskich szpitalach odpowiedzialne były przede wszystkim CA-MRSA (community-acquired methicillin resistance *S. aureus*) należące do grupy *agr-I* [96]. Przyczyny takich korelacji są trudne do wyjaśnienia, być może z określonym genotypem *agr* związane jest występowanie lub ekspresja innych genów, które w pewnym stopniu determinują fenotyp i tropizm tkankowy szczepu bakteryjnego.

Dowiedziono również, że MRSA należące do typu *agr-II* mają podwyższoną zdolność o wytwarzania biofilmu [11, 85], co związane jest z dużą częstością występowania zakażeń odcewnikowych oraz innych,

⁶⁾ *lrgAB* – geny kodujące sekrecyjne białka LrgA i B podobne do holiny, które hamują aktywność enzymów hydrolitycznych mureiny

⁷⁾ *ssaA* – gen kodujący antygen sekrecyjny SsaA

⁸⁾ *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* – geny kodujące białka adhezyjne SdrC, SdrD, i SdrE, z grupy MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)

⁹⁾ *ssp* – gen kodujący proteazę serynową Ssp

¹⁰⁾ *spl* – gen kodujący proteazę serynową Spl

¹¹⁾ *norA* – gen kodujący pompę błonową warunkującą wielolekooporność *S. aureus*

¹²⁾ *lukE*, *lukF-PV*, *lukM*, *lukO*, *lukS-PV* – geny kodujące leukotoksyny np.: LukO+LukE, LukF-PV+LukS-PV

¹³⁾ *hlg* – gen kodujący potencjalne białko błonowe o właściwościach dehydratazy serynowej (gamma-hemolizyna)

¹⁴⁾ *ebh* – gen kodujący potencjalne białko powierzchniowe o właściwościach adhezyjnych (MSCRAMM), wiąże fibronektynę

¹⁵⁾ *tsst-1* – gen kodujący toksynę 1 zespołu szoku toksycznego TSST-1

¹⁶⁾ *fnb* – gen kodujący białko wiążące fibronektynę (MSCRAMM)

¹⁷⁾ *set12* – gen kodujący egzotoksynę 12

¹⁸⁾ *set14* – gen kodujący egzotoksynę 14

¹⁹⁾ *nuc* – gen kodujący nukleazę

²⁰⁾ *sak* – gen kodujący prekursor stafilokinazy

²¹⁾ *sod* – gen kodujący dysmutazę ponadtlenkową

²²⁾ *mrp* – gen kodujący potencjalne białko błonowe o właściwościach kanału transportera

²³⁾ *fib* – gen kodujący potencjalne białko wiążące fibrynogen (MSCRAMM)

²⁴⁾ *isaB* – gen kodujący potencjalne białko o właściwościach hemaglutyniny

²⁵⁾ *hflIX* – gen kodujący białko podobne do protein wiążących GTP

²⁶⁾ *clfA* – gen kodujący czynnik clumping factor A (CF-A) (MSCRAMM), białko wiążące fibrynogen

²⁷⁾ *hsr* – gen kodujący białko odpowiedzi szoku cieplnego

²⁸⁾ *osr* – gen kodujący białko odpowiedzi na szok oksydacyjny

których źródłem są narzędzia i urządzenia medyczne [11]. Wiadomo jest, że za zdolność bakterii do wytwarzania biofilmu, w dużej mierze odpowiedzialne są adhezyny i białka związane ze strukturami powierzchniowymi komórki patogenu. Wiadomo również, że system *agr* w naturalnych warunkach pełni funkcję inhibitora ekspresji białek powierzchniowych *S. aureus* w późnej fazie wzrostu logarytmicznego oraz w fazie stacjonarnej. W tym aspekcie istotna wydaje się informacja, że wszystkie izolaty *agr* typu II, o podwyższonej zdolności do produkcji biofilmu, były defektywne w systemie *agr* [11, 85], co może wyjaśniać fenomen fenotypu hiperadherentnego.

Ponadto wydaje się, że istnieje pewna korelacja między systemem regulacyjnym *agr* a wyrażaniem się fenotypu GISA i h-GISA (glycopeptide intermediate resistance *S. aureus*, heterogeneous-GISA). Są to szczepy gronkowca złocistego o obniżonej wrażliwości na glikopeptydy (GISA) i na zróżnicowanym poziomie (h-GISA), które przysparzają coraz więcej problemów w leczeniu ciężkich infekcji o etiologii MRSA. Mechanizm tej oporności do tej pory nadal nie został do końca wyjaśniony [14]. Badania dowodzą, że najprawdopodobniej system *agr* uczestniczy w wyrażaniu się fenotypu GISA [35, 80, 85, 91]. Analiza na modelu farmakodynamicznym wykazuje, że zmutowane szczepy *S. aureus* ze wszystkich czterech grup *agr*, defektywne w systemie *agr*, mogą osiągać wartość MIC (minimal inhibitory concentration) dla wankomycyny nawet 6 do 8 µg/ml, co jest wartością 2–3-krotnie wyższą w porównaniu z dzikimi szczepami *agr* [80, 91]. Jednakże jedynie mutanty *agr*⁻ z grupy *agr*-II, charakteryzowały się najwyższą wartością MIC (8 µg/ml). Zatem wydaje się, że brak aktywnego systemu regulacyjnego ułatwia drobnoustrojom przetrwanie w warunkach presji niektórych czynników chemioterapeutycznych (wankomycyny). Podobne wyniki uzyskano stosując metodę analizy RLFP/*Sma*I na izolatach klinicznych GISA i h-GISA również defektywnych w systemie *agr* [85]. Szczepy te, posiadające liczne mutacje punktowe, delecyjne, insercyjne w operonach P2 i P3, były niezdolne do produkcji δ-lizyny i jednocześnie przeżywały na podłożach zawierających podwyższone stężenie wankomycyny 4 µg/ml [85]. Badania te pozwalają stwierdzić współwystępowanie fenotypu GISA z genotypem *agr*⁻, ale dotyczy to tylko szczepów należących do grupy *agr* II [62, 84, 85]. Dotychczas nie zostały wyjaśnione przyczyny opisanych korelacji, wynika to nadal z niedostatecznej wiedzy na temat funkcji systemu *agr*. Najprawdopodobniej, oprócz funkcji autoregulacyjnej oraz regulatorowej podczas ekspresji czynników wirulencji system *agr* może wpływać również na syntezę ściany komórkowej szczepów gronkowca złocistego. Z badań przeprowadzonych w 2005 roku wynika, że szczepy *S. aureus* typu *agr*-II,

agr – defektywne, wykazywały obniżoną zdolność autolityczną [83]. Zatem można domniemywać, że *agr* jest aktywatorem ekspresji hydrolaz ściany komórkowej i dlatego jego dysfunkcja zaburza procesy autolizy, prowadząc do powstania ściany komórkowej o nietypowej grubości [83, 86]. Taki fenotyp jest najprawdopodobniej jednym z mechanizmów warunkujących powstawanie szczepów *S. aureus* o obniżonej wrażliwości na glikopeptydy.

2.2. Inne systemy TCSTS uczestniczące w regulacji ekspresji genów *S. aureus*

U *S. aureus* oprócz systemu *agr* zidentyfikowano jeszcze kilka innych dwuskładnikowych układów quorum sensing uczestniczących w regulacji mechanizmów patogenez. Zaliczamy do nich: *saeR/S*, *srrA/B*, *arlR/S*, *lytR/S* oraz omówiony w podrozdziale 2.1.6.3. system *rap/traP*. Informacje na temat organizacji i funkcji tych systemów zostały umieszczone w tabeli II.

3. Inne czynniki regulacyjne ekspresji genów *S. aureus*, nie będące TCSTS

Poza dwuskładnikowymi systemami regulatorowymi TCSTS u gronkowca złocistego zostało opisanych kilka innych czynników, uczestniczących w regulacji ekspresji genów kodujących między innymi determinanty wirulencji. Zaliczamy do nich: i) mechanizm pozytywnej i negatywnej regulacji z udziałem antysensownego RNA (podrozdz. 2.1.5.2.); ii) czynniki transkrypcyjne: RNA III (podrozdz. 2.1.5.1. oraz 2.1.5.2.); białka z rodziny SarA (podrozdz. 2.1.6.2. oraz tabela II); MgrA, Rot, Sigma_B (Tabela II), posiadające zdolność wiązania DNA w miejscach promotorowych genów, aktywując bądź hamując ich transkrypcję; iii) białka o aktywności proteolitycznej (ClpX/P), działające na dojrzwały produkt genów (Tabela II).

4. Podsumowanie

S. aureus jest ludzkim, oportunistycznym patogenem, mogącym wywoływać groźne zakażenia zarówno szpitalne, jak i pozaszpitalne. Rozwój infekcji warunkowany jest zdolnością wytwarzania przez bakterię licznych czynników wirulencji, tzw. *vir*: i) białek powierzchniowych, o właściwościach antygenowych i adherentnych, determinujących pierwszy etap kolonizacji; ii) wydzielanych na zewnątrz komórki toksyn i enzymów prowadzących, poprzez destrukcję tkanek, do rozprzestrzeniania się infekcji. Ekspresja determinant wirulencji oraz innych genów, związanych z metabolizmem podstawowym, może podlegać regulacji

na różnych poziomach i może być kontrolowana przez wiele różnych mechanizmów. Do najważniejszych zaliczamy tzw. dwuskładnikowe systemy quorum sensing, z których każdy zawiera białko sensorowe o aktywności kinazy histydynowej oraz białko odpowiedzi RR. Jak dotąd u *S. aureus* poznano 16 tego typu mechanizmów. Aktywacja tych układów jest uzależniona od czynników zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i środowiskowych. Istotną rolę odgrywa również mechanizm pozytywno/negatywnej regulacji przez małe antysensowne cząsteczki RNA, RNA III, które przyłączając się do odpowiednich sekwencji mRNA prowadzą do inicjacji lub inhibicji procesu translacji. Ponadto ekspresja determinant *vir* może być aktywowana lub hamowana na etapie inicjacji transkrypcji, przez czynniki transkrypcyjne, posiadające zdolność wiązania DNA w regionach promotorowych genów. Także degradacja dojrzałych produktów genów może w sposób bezpośredni lub pośredni wpływać na wyrażanie zjadliwego fenotypu patogenu.

Procesy regulacji ekspresji czynników wirulencji *S. aureus* są bardzo złożone i wysoce specyficzne. Każdy z systemów regulatorowych, w określonych warunkach, może bezpośrednio wpływać na geny kodujące determinanty chorobotwórczości, ale jednocześnie ekspresja genów strukturalnych tych systemów również podlega regulacji przez inne mechanizmy. Dokładne powiązania i zależności między systemami regulatorowymi nadal nie są do końca wyjaśnione i wymagają dalszych badań. Wiadomo jednak, że dzięki nim drobnoustroje posiadają zdolność do adaptacji do różnych warunków środowiskowych. Ponad to determinują one kontrolowaną syntezę oraz wydzielanie właściwych czynników wirulencji, w odpowiednim czasie tak, aby zapewnić komórkom drobnoustroju możliwość przetrwania i rozwoju w niemalże każdej tkance ludzkiego organizmu i w niemalże każdych warunkach.

Piśmiennictwo

- Adhikari R.P., Arvidson S., Novick R.P.: A nonsense mutation in *agrA* accounts for the defect in *agr* expression and the avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 *traP::kan*. *Infect. Immun.* **75**, 4534–4540 (2007)
- Adhikari R.P., Novick R.P.: Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus. *Microbiology*, **154**, 949–959 (2008)
- Balaban N., Goldkorn T., Gov Y., Hirshberg M., Koyfman N., Matthews H.R., Nhan R.T., Singh B., Uziel O.: Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNA-III-activating protein (TRAP). *J. Biol. Chem.* **276**, 2658–2667 (2001), Erratum in: *J. Biol. Chem.* **276**, 12476 (2001), *J. Biol. Chem.* **276**, 20803 (2001)
- Balaban N., Novick R.P.: Translation of RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**, 155–161 (1995)
- Bayer M.G., Heinrichs J.H., Cheung A.L.: The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 4563–4570 (1996)
- Benito Y., Kolb F.A., Romby P., Lina G., Etienne J., Vandenesch F.: Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA*, **6**, 668–679 (2000)
- Boisset S., Geissmann T., Huntzinger E., Fechter P., Bendridi N., Possedko M., Chevalier C., Helfer A.C., Benito Y., Jacquier A., Gaspin C., Vandenesch F., Romby P.: *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* **21**, 1353–1366 (2007)
- Bronner S., Monteil H., Prévost G.: Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 183–200 (2004)
- Brunskill E.W., Bayles K.W.: Identification and molecular characterization of a putative locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 611–618 (1996)
- Brunskill E.W., Bayles K.W.: Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 5810–5812 (1996)
- Cafiso V., Bertuccio T., Santagati M., Demelio V., Spina D., Nicoletti G., Stefani S.: *agr*-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**, 220–227 (2007)
- Cheung A.L., Bayer A.S., Zhang G., Gresham H., Xiong Y.Q.: Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**, 1–9 (2004)
- Cheung A.L., Nishina K.A., Trotonda M.P., Tamber S.: The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 355–361 (2008)
- Cui L., Iwamoto A., Lian J.Q., Neoh H.M., Maruyama T., Horikawa Y., Hiramatsu K.: Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 428–38 (2006)
- Dufour P., Jarraud S., Vandenesch F., Greenland T., Novick R.P., Bes M., Etienne J., Lina G.: High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J. Bacteriol.* **184**, 1180–1186 (2002)
- Dunman P.M., Murphy E., Haney S., Palacios D., Tucker-Kellogg G., Wu S., Brown E.L., Zagursky R.J., Shlaes D., Projan S.J.: Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J. Bacteriol.* **183**, 7341–7353 (2001)
- Dutta R., Qin L., Inouye M.: Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**, 633–640 (1999)
- Foster T.J., Höök M.: Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **6**, 484–488 (1998)
- Fournier B., Aras R., Hooper D.C.: Expression of the multi-drug transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **182**, 664–671 (2000)
- Fournier B., Hooper D.C.: A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**, 3955–3964 (2000)
- Fournier B., Klier A., Rapoport G.: The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 247–261 (2001)

22. Fournier B., Klier A.: Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the ArlS-ArlR two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **150**, 3807–3819 (2004)
23. Frees D., Sørensen K., Ingmer H.: Global virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: pinpointing the roles of ClpP and ClpX in the *sar/agr* regulatory network. *Infect. Immun.* **73**, 8100–8108 (2005)
24. Gaskill M.E., Khan S.A.: Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **263**, 6276–6280 (1988)
25. Geisinger E., Adhikari R.P., Jin R., Ross H.F., Novick R.P.: Inhibition of *rot* translation by RNAIII, a key feature of *agr* function. *Mol. Microbiol.* **61**, 1038–1048 (2006)
26. Geisinger E., George E.A., Muir T.W., Novick R.P.: Identification of ligand specificity determinants in AgrC, the *S. aureus* quorum sensing receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 8930–8938 (2008)
27. George E.A., Muir T.W.: Molecular mechanisms of *agr* quorum sensing in virulent *Staphylococci*. *Chem. Bio. Chem.* **8**, 847–855 (2007)
28. Gilot P., Lina G., Cochard T., Poutrel B.: Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components *agr* and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4060–4067 (2002)
29. Giraudo A.T., Calzolari A., Cataldi A.A., Bogni C., Nagel R.: The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 15–22 (1999), Erratum in: *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 117 (1999)
30. Giraudo A.T., Cheung A.L., Nagel R.: The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* **168**, 53–58 (1997)
31. Goerke C., Fluckiger U., Steinhuber A., Bisanzio V., Ulrich M., Bischoff M., Patti J.M., Wolz C.: Role of *Staphylococcus aureus* global regulators *sae* and Sigma_B in virulence gene expression during device-related infection. *Infect. Immun.* **73**, 3415–3421 (2005)
32. Gov Y., Borovok I., Korem M., Singh V.K., Jayaswal R.K., Wilkinson B.J., Rich S.M., Balaban N.: Quorum sensing in *Staphylococci* is regulated via phosphorylation of three conserved histidine residues. *J. Biol. Chem.* **279**, 14665–14672 (2004)
33. Groicher K.H., Firek B.A., Fujimoto D.F., Bayles K.W.: The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **182**, 1794–1801 (2000)
34. Heinrichs J.H., Bayer M.G., Cheung A.L.: Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 418–423 (1996)
35. Howe R.A., Monk A., Wootton M., Walsh T.R., Enright M.C.: Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 855–857 (2004)
36. Huntzinger E., Boisset S., Saveanu C., Benito Y., Geissmann T., Namane A., Lina G., Etienne J., Ehresmann B., Ehresmann C., Jacquier A., Vandenesch F., Romby P.: *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J.* **24**, 824–835 (2005)
37. Janzon L., Arvidson S.: The role of delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* **9**, 1391–1399 (1990)
38. Janzon L., Lofdahl S., Arvidson S.: Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 480–485 (1989)
39. Jarraud S., Lyon G.J., Figueiredo A.M., Gérard L., Vandenesch F., Etienne J., Muir T.W., Novick R.P.: Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**, 6517–6522 (2000)
40. Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F., Nesme X., Etienne J., Vandenesch F.: Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* **70**, 631–641 (2002)
41. Ji G., Beavis R., Novick R.P.: Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, **276**, 2027–2030 (1997)
42. Ji G., Beavis R.C., Novick R.P.: Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12055–12059 (1995)
43. Koenig R.L., Ray J.L., Maleki S.J., Smeltzer M.S., Hurlburt B.K.: *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-*agr* regulatory region. *J. Bacteriol.* **186**, 7549–7555 (2004)
44. Korem M., Gov Y., Kiran M.D., Balaban N.: Transcriptional profiling of target of RNAIII-activating protein, a master regulator of staphylococcal virulence. *Infect. Immun.* **73**, 6220–6228 (2005)
45. Korem M., Sheoran A.S., Gov Y., Tzipori S., Borovok I., Balaban N.: Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 167–175 (2003)
46. Korem M., Sheoran A.S., Gov Y., Tzipori S., Borovok I., Balaban N.: Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 167–175 (2003)
47. Liang X., Zheng L., Landwehr C., Lunsford D., Holmes D., Ji Y.: Global regulation of gene expression by ArlRS, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **187**, 5486–5492 (2005)
48. Lina G., Jarraud S., Ji G., Greenland T., Pedraza A., Etienne J., Novick R.P., Vandenesch F.: Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **28**, 655–662 (1998)
49. Liu Y., Manna A.C., Pan C.H., Kriksunov I.A., Thiel D.J., Cheung A.L., Zhang G.: Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2392–2397 (2006)
50. Luong T.T., Dunman P.M., Murphy E., Projan S.J., Lee C.Y.: Transcription profiling of the *mgrA* regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 1899–1910 (2006)
51. Luong T.T., Lee C.Y.: The *arl* locus positively regulates *Staphylococcus aureus* type 5 capsule via an MgrA-dependent pathway. *Microbiology*, **152**, 3123–3131 (2006)
52. Lyon G.J., Mayville P., Muir T.W., Novick R.P.: Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, *AgrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13330–13335 (2000)
53. Lyon G.J., Wright J.S., Muir T.W., Novick R.P.: Key determinants of receptor activation in the *agr* autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **41**, 10095–10104 (2002)
54. Malone C.L., Boles B.R., Horswill A.R.: Biosynthesis of *Staphylococcus aureus* autoinducing peptides by using the

- synechocystis DnaB mini-intein. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6036–6044 (2007)
55. Manna A.C., Cheung A.L.: Expression of SarX, a negative regulator of *agr* and exoprotein synthesis, is activated by MgrA in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 4288–4299 (2006)
 56. Manna A.C., Cheung A.L.: Transcriptional regulation of the *agr* locus and the identification of DNA binding residues of the global regulatory protein SarR in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **60**, 1289–1301 (2006)
 57. Mayville P., Ji G., Beavis R., Yang H., Goger M., Novick R.P., Muir T.W.: Structure-activity analysis of synthetic auto-inducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1218–1223 (1999)
 58. McDevitt D., François P., Vaudaux P., Foster T.J.: Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **11**, 237–248 (1994)
 59. McNamara P.J., Milligan-Monroe K.C., Khalili S., Proctor R.A.: Identification, cloning, and initial characterization of *rot*, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**, 3197–3203 (2000)
 60. MDowell P., Affas Z., Reynolds C., Holden M.T., Wood S.J., Saint S., Cockayne A., Hill P.J., Dodd C.E., Bycroft B.W., Chan W.C., Williams P.: Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 503–512 (2001)
 61. Michel A., Agerer F., Hauck C.R., Herrmann M., Ullrich J., Hacker J., Ohlsen K.: Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair. *J. Bacteriol.* **188**, 5783–579 (2006)
 62. Moise-Broder P.A., Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Schentag J.J., Forrest A., Moellering R.C. Jr.: Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1700–1705 (2004)
 63. Monecke S., Slickers P., Ehricht R.: Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**, 237–251 (2008)
 64. Monecke S., Slickers P., Ellington M.J., Kearns A.M., Ehricht R.: High diversity of Pantone-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 1157–1164 (2007)
 65. Morfeldt E., Panova-Sapundjieva I., Gustafsson B., Arvidson S.: Detection of the response regulator AgrA in the cytosolic fraction of *Staphylococcus aureus* by monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**, 195–201 (1996)
 66. Morfeldt E., Taylor D., von Gabain A., Arvidson S.: Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* **14**, 4569–4577 (1995)
 67. Morfeldt E., Tegmark K., Arvidson S.: Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **21**, 1227–1237 (1996)
 68. Nikolskaya A.N., Galperin M.Y.: A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2453–2459 (2002)
 69. Novick R.P., Ross H.F., Projan S.J., Kornblum J., Kreiswirth B., Moghazeh S.: Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* **12**, 3967–3975 (1993)
 70. Novick R.P.: Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* **48**, 1429–1449 (2003)
 71. Oscarsson J., Harlos C., Arvidson S.: Regulatory role of proteins binding to the *spa* (protein A) and *sarS* (staphylococcal accessory regulator) promoter regions in *Staphylococcus aureus* NTCC 8325-4. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**, 253–266 (2005)
 72. O'Toole P.W., Foster T.J.: Nucleotide sequence of the epidermolytic toxin A gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **169**, 3910–3915 (1987)
 73. Otto M.: *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator *agr* system. *Peptides*, **22**, 1603–1608 (2001)
 74. Peng H.L., Novick R.P., Kreiswirth B., Kornblum J., Schlievert P.: Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**, 4365–4372 (1988)
 75. Podbielski A., Kreikemeyer B.: Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int. J. Infect. Dis.* **8**, 81–95 (2004)
 76. Pragman A.A., Yarwood J.M., Tripp T.J., Schlievert P.M.: Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**, 2430–2438 (2004)
 77. Qiu R., Pei W., Zhang L., Lin J., Ji G.: Identification of the putative staphylococcal AgrB catalytic residues involving the proteolytic cleavage of AgrD to generate autoinducing peptide. *J. Biol. Chem.* **280**, 16695–16704 (2005)
 78. Recsei P., Kreiswirth B., O'Reilly M., Schlievert P., Gruss A., Novick R.P.: Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Br. J. Dermatol.* **139**, Suppl. 53, 9–12 (1998)
 79. Roberts C., Anderson K.L., Murphy E., Projan S.J., Mounts W., Hurlburt B., Smeltzer M., Overbeek R., Disz T., Dunman P.M.: Characterizing the effect of the *Staphylococcus aureus* virulence factor regulator, SarA, on log-phase mRNA half-lives. *J. Bacteriol.* **188**, 2593–2603 (2006)
 80. Rose W.E., Rybak M.J., Tsuji B.T., Kaatz G.W., Sakoulas G.: Correlation of vancomycin and daptomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* in reference to accessory gene regulator (*agr*) polymorphism and function. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 1190–1193 (2007)
 81. Saenz H.L., Augsburger V., Vuong C., Jack R.W., Götz F., Otto M.: Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch. Microbiol.* **174**, 452–455 (2000)
 82. Sad'd-Salim B., Dunman P.M., McAleese F.M., Macapagal D., Murphy E., McNamara P.J., Arvidson S., Foster T.J., Projan S.J., Kreiswirth B.N.: Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J. Bacteriol.* **185**, 610–619 (2003)
 83. Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Fowler V.G. Jr, Moellering R.C. Jr, Novick R.P., Lucindo N., Yeaman M.R., Bayer A.S.: Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (*agr*) function. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2687–2692 (2005)
 84. Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Moellering R.C. Jr, Novick R.P., Venkataraman L., Wennersten C., DeGirolami P.C.,

- Schwaber M.J., Gold H.S.: *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance. *J. Infect. Dis.* **187**, 929–938 (2003)
85. Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Moellering R.C. Jr, Wennersten C., Venkataraman L., Novick R.P., Gold H.S.: Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1492–1502 (2002)
86. Sakoulas G., Moellering R.C. Jr, Eliopoulos G.M.: Adaptation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. *Clin. Infect. Dis.* **42**, Suppl. 1, 40–50 (2006)
87. Shaw L.N., Jonsson I.M., Singh V.K., Tarkowski A., Stewart G.C.: Inactivation of *traP* has no effect on the *agr* quorum-sensing system or virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **75**, 4519–4527 (2007)
88. Shopsin B., Mathema B., Alcabes P., Said-Salim B., Lina G., Matsuka A., Martinez J., Kreiswirth B.N.: Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 456–459 (2003)
89. Steinhuber A., Goerke C., Bayer M.G., Doring G., Wolz C.: Molecular architecture of the regulatory locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **185**, 6278–6286 (2003)
90. Throup J.P., Zappacosta F., Lunsford R.D., Annan R.S., Carr S.A., Lonsdale J.T., Bryant A.P., McDevitt D., Rosenberg M., Burnham M.K.R.: The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry*, **40**, 10392–10401 (2001)
91. Tsuji B.T., Rybak M.J., Lau K.L., Sakoulas G.: Evaluation of accessory gene regulator (*agr*) group and function in the proclivity towards vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1089–1091 (2007)
92. Vandenesch F., Kornblum J., Novick R.P.: A temporal signal, independent of *agr*, is required for *hla* but not *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **173**, 6313–6320 (1991)
93. Wright III J.S., Traber K.E., Corrigan R., Benson S.A., Musser J.M., Novick R.P.: The *agr* radiation: an early event in the evolution of *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* **187**, 5585–5594 (2005)
94. Wright J.S. 3rd, Lyon G.J., George E.A., Muir T.W., Novick R.P.: Hydrophobic interactions drive ligand-receptor recognition for activation and inhibition of staphylococcal quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16168–16173 (2004)
95. Yarwood J.M., McCormick J.K., Schlievert P.M.: Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors. *J. Bacteriol.* **183**, 1113–1123 (2001)
96. Yoon H.J., Choi J.Y., Lee K., Yong D., Kim J.M., Song Y.G.: Accessory gene regulator group polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an association with clinical significance. *Yonsei Med. J.* **48**, 176–183 (2007)
97. Zhang L., Gray L., Novick R.P., Ji G.: Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **277**, 34736–34742 (2002)
98. Zhang L., Ji G.: Identification of a staphylococcal AgrB segment(s) responsible for group-specific processing of AgrD by gene swapping. *J. Bacteriol.* **186**, 6706–6713 (2004)
99. Zhang L., Lin J., Ji G.: Membrane anchoring of the AgrD N-terminal amphipathic region is required for its processing to produce a quorum-sensing pheromone in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 19448–19456 (2004)
100. Ziebandt A.K., Becher D., Ohlsen K., Hacker J., Hecker M., Engelmann S.: The influence of *agr* and Σ_{aB} in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Proteomics*, **4**, 3034–3047 (2004)

SYSTEM INTERFERENCYJNEGO RNA BAKTERII (CRISPR-CAS) I JEGO ROLA W OBRONIE PRZED INFEKCJĄ FAGOWĄ

Adam Jaworski, Anita Dobrowolska*

Zakład Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytet Łódzki 91-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

Wpłynęło w październiku 2008 r.

1. Rys historyczny. 2. Zróżnicowanie strukturalne systemu CRISPR w świecie bakterii. 3. System CRISPR-CAS analogiem systemu interferencyjnego RNA eukriontów. 4. Możliwości praktycznych zastosowań systemu CRISPR-CAS

Organization of the bacterial interference RNAi-like system (CRISPR-CAS) and its role against bacteriophages

Abstract: Clustered, regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) are present in the genomes of many different species of bacteria and archaea. They are composed of direct repeats (DRs) that are separated by non-repetitive spacers. Sets of CRISPR sequences together with associated proteins encoded by a group of *cas* genes are involved in resistance to bacteriophages. The structure and the antiviral activity of this new resistance mechanism in bacteria and archaea as well as the possibilities of its present and future applications are discussed in this article.

1. History of CRISPR research. 2. Structural features of CRISPR system. 3. CRISPR as an analog of eukaryotic interference RNAi system. 4. Present and future possibilities of application

Słowa kluczowe: geny i białka grupy CAS, nowy system obrony bakterii przed bakteriofagami, trakty powtórzonych sekwencji DNA (CRISPR)

Key words: CAS (CRISPR associated sequences), CRISPR (clustered, regularly interspaced short palindromic sequences), new bacterial system against bacteriophages

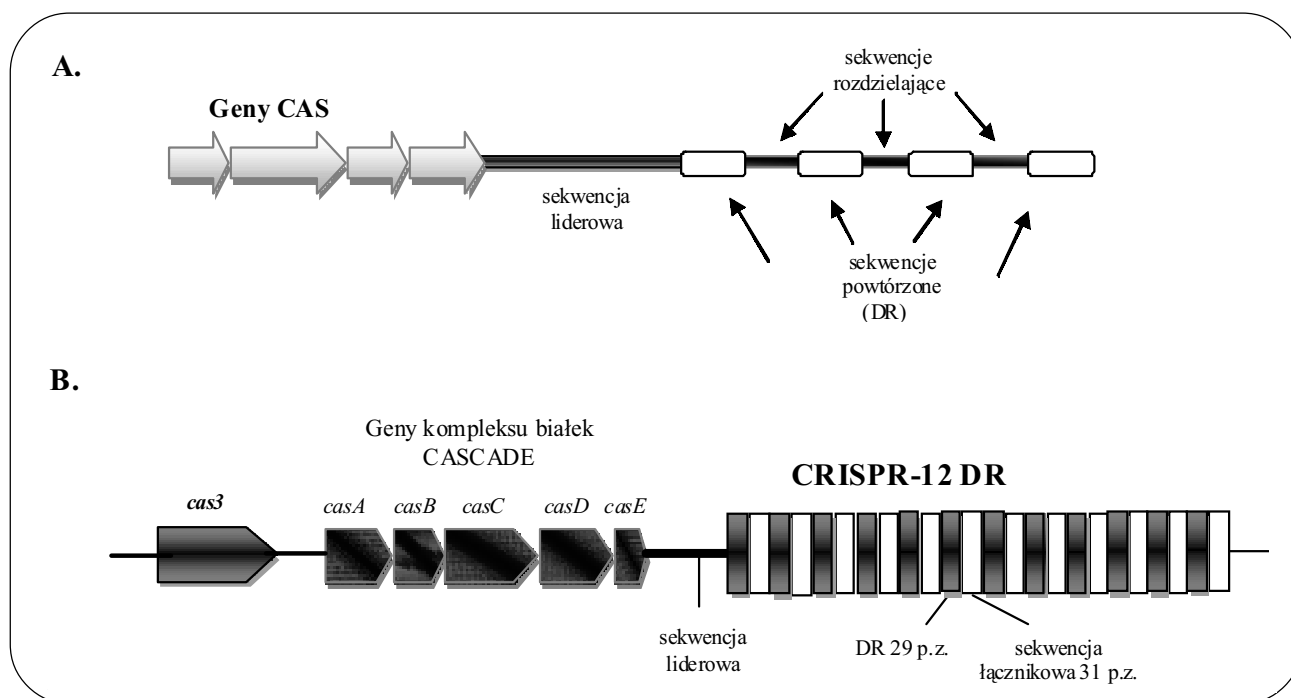
1. Rys historyczny

Szlak zgrupowanych, regularnie rozmieszczonych, krótkich sekwencji palindromowych CRISPR (ang. *clustered, regularly interspaced short palindromic repeats*) zidentyfikowano po raz pierwszy w genomie *E. coli* w 1987 roku [16]. Okazało się, że sekwencja ta, przylegająca bezpośrednio do genu *iap* kodującego syntezę alkalicznej fosfatazy, złożona jest z 14 prostych powtórzeń (ang. *direct repeats* – DRs) zbudowanych z 29 nukleotydów, rozdzielonych unikatowymi sekwencjami łącznikowymi (ang. *spacers*) o długości 33 nukleotydów [20, 27]. Całe szlaki CRISPR mogą być zbudowane, w zależności od gatunku bakterii, nawet z 250 takich elementów (Rys. 1). W latach 90-tych ubiegłego wieku zidentyfikowano i scharakteryzowano ciągi sekwencji CRISPR w genomach *Mycobacterium tuberculosis* [15], *Haloferax mediterranei* [24], *Methanocaldococcus jannaschii* [6] i *Termotoga maritima* [28]. Sekwencje CRISPR są szeroko rozpowszechnione w świecie bakterii, do roku 2007 zidentyfikowano je w genomach 232 gatunków, w tym w 40% zsekwencjonowanych genomach prokariotów właściwych i aż w 90% genomach archeonów [2, 10, 12, 13, 25].

W latach 2002–2006 doniesiono o identyfikacji nieznanych dotąd genów, nazwanych genami *cas* (ang. *CRISPR associated sequences*), z racji ich położenia w sąsiedztwie traktów CRISPR, z którymi połączone są przez sekwencję liderową (ang. *leader sequence*). Początkowo w analizowanych genomach zidentyfikowano cztery geny *cas* [17,18], ale dalsze analizy przeprowadzone dla dużej liczby różnych gatunków bakterii pozwoliły zidentyfikować około 45 różnych takich genów [13, 22, 23]. Okazało się także, że niektóre z genów rodziny *cas* nie występują w genomach gatunków bakterii pozbawionych sekwencji CRISPR [20], co sugerowało, iż geny te spełniają jakąś funkcję biologiczną, ściśle związaną z obecnością i funkcją systemu CRISPR.

Od ponad 10 lat trwają dyskusje na temat funkcji biologicznych spełnianych przez elementy CRISPR. Sugerowano, że wzrost liczby kopii tego elementu u *Haloferax volcanii* zaburza proces prawidłowej segregacji chromosomów do komórek potomnych (ang. *replicon partitioning*) [24]. Tej obserwacji nie udało się jednak potwierdzić w badaniach segregacji chromosomów u *Mycobacterium tuberculosis* [17, 18]. Nie wykluczano również możliwości, że sekwencje CRISPR są ruchomymi elementami genetycznymi

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytet Łódzki 91-237 Łódź, ul. Banacha 12/16, e-mail: anidobro@biol.uni.lodz.pl



Rys. 1. Ogólny schemat organizacji bakteryjnego systemu CRISPR-CAS (A) oraz schemat organizacji systemu CRISPR-CAS *Escherichia coli* (B) (dodatkowe informacje w tekście)

z racji ich obecności w genomach niektórych bakterii w wielu kopiach [17, 18]. Formułowano także opinie o ich udziale w systemach naprawy DNA, ponieważ okazało się, że białka kodowane przez wiele genów systemu CRISPR zawierają specyficzne domeny oddziaływujące z DNA [22]. W 2005 roku pojawiły się pierwsze hipotezy na temat ich udziału w nadawaniu komórkom bakterii odporności na infekcje fagami, plazmidami koniugacyjnymi i transpozonami [3, 26, 30]. Okazało się bowiem, że sekwencje łącznikowe często zawierają fragmenty DNA fagów lub plazmidów; obserwowano również odwrotnie proporcjonalną korelację pomiędzy wrażliwością na infekcje fagami a liczbą powtarzających się sekwencji łącznikowych w CRISPR. Pod koniec 2007 roku ukazały się prace, w których potwierdzono doświadczalnie, że fragmenty DNA fagów, wbudowane w czasie infekcji fagowej do CRISPR jako nowe sekwencje łącznikowe, nadają komórkom trwałą odporność na kolejną infekcję tym fagiem [1, 8]. We wrześniu 2008 potwierdzono jednoznacznie, że bakteryjny system CRISPR funkcjonuje analogicznie do systemu interferencyjnego RNA w komórkach organizmów eukariotycznych [4, 37].

Rekonstrukcję modelowego systemu CRISPR-CAS *E. coli*-fag λ oraz genetyczną i biochemiczną charakterystykę jego ważnej aktywności biologicznej należy uznać za duże osiągnięcie naukowe w mikrobiologii o charakterze poznawczym, a także za ważne odkrycie dla praktyki przemysłowej, wykorzystującej bakterie w procesach biotechnologicznych, narażonych na groźne infekcje fagowe.

2. Charakterystyka strukturalnego zróżnicowania systemu CRISPR w świecie bakterii

Identyfikacja systemów CRISPR u co raz większej liczby gatunków bakterii właściwych i archeonów oraz dokładna analiza ich budowy wskazały, że generalny plan budowy tych powtórzonych szlaków jest konserwatywny w całym świecie bakterii. Jednakże poszczególne elementy tego systemu są dość znacznie zróżnicowane, co dotyczy zarówno prostych powtórzeń jak i sekwencji łącznikowych oraz genów *cas* (Rys. 1A). Wielkość sekwencji powtórzonych, w zależności od gatunku bakterii, waha się od 24 do 47 nukleotydów, a wielkość sekwencji łącznikowych od 26 do 72 nukleotydów. Zróżnicowana jest także liczba powtórzeń w traktach CRISPR, od 2 u niektórych gatunków bakterii właściwych do nawet 249 u *Verminephrobacter eisenia* [11, 12, 17, 18]. Ponadto, niektóre gatunki bakterii zawierają 1 kopię CRISPR w określonym *locus* genomu, inne jak np. *M. jannaschii*, aż 18 w różnych regionach genomu [6]. Podobne zróżnicowanie dotyczy liczby zidentyfikowanych genów *cas*, od kilku do 20, a nawet więcej [13].

Analiza stopnia homologii prostych powtórzeń dla wielu różnych gatunków bakterii właściwych i archeonów pozwoliła dotychczas wyróżnić wśród nich 12 grup. Najliczniejsza grupa obejmuje sekwencje palindromowe o wielkości 5–7 nukleotydów [17, 18]. Odkrycie, że sekwencje palindromowe, wraz z sekwencjami łącznikowymi, podlegają transkrypcji, a syntetyzowany mRNA może w tych rejonach tworzyć

strukturę pętli (*stem-loop secondary structure*), było szczególnie ważne dla rozważań na temat funkcji biologicznej systemu CRISPR [20, 21, 34, 35]. Dalsze szczegółowe analizy dowiodły, że wiele prostych powtórzeń charakteryzuje się obecnością konserwatywnej sekwencji GAAA(C/G) zlokalizowanej na końcu 3', prawdopodobnie odpowiedzialnej za wiązanie specyficznych białek komórkowych, co dodatkowo wskazywało na istotną funkcję biologiczną CRISPR [20].

Poszczególne nukleotydowe sekwencje łącznikowe, rozdzielające kolejne proste powtórzenia w określonym trakcie CRISPR, charakteryzują się bardzo dużą różnorodnością. Szczegółowe analizy sekwencji tych elementów, przeprowadzone dla dużej liczby CRISPR różnych gatunków bakterii, ujawniły ich duże pokrewieństwo do DNA fagów i innych ekstrachromosomalnych elementów genetycznych [3, 21, 26]. Badania przeprowadzone dla 4500 sekwencji łącznikowych u 67 gatunków prokariotów dowiodły, że sekwencje nukleotydowe jedynie 88 z nich (2%) wykazywały podobieństwo do znanych sekwencji zdeponowanych w światowych bazach danych, wśród których 60% stanowiły sekwencje znanych fagów i plazmidów. Udało się także ustalić, po pierwsze, że sekwencje łącznikowe zostały przeniesione do traktów CRISPR z kodujących lub niekodujących nici DNA fagów, i po drugie, że tego typu sekwencje obficie występują w różnych regionach genomów wielu znanych fagów [1, 21, 26, 30]. Wyniki ostatnio opublikowanych prac wskazują, że w sąsiedztwie sekwencji fagowych (przy ich końcu 3'), homologicznych do sekwencji łącznikowych CRISPR, znajdują się motywy AGAA lub GGNG, które prawdopodobnie są miejscami rozpoznania lub cięcia dla produktów systemu CRISPR [1, 8]. Można sądzić, że w miarę identyfikacji oraz poznawania sekwencji nukleotydowych genomów nieznanymi dotychczas fagów i plazmidów, bytujących w hodowlanych i niehodowlanych mikroorganizmach środowiskowych, możliwym będzie ustalenie pochodzenia coraz większej liczby sekwencji łącznikowych systemu CRISPR. Potwierdzeniem są opublikowane niedawno dane dla bakterii mlekowych *Lactococcus lactis*. W szczepach tego gatunku, noszących wiele różnych fagów i plazmidów o znanej sekwencji nukleotydowej, udało się ustalić fagowe lub plazmidowe pochodzenie ponad 40% sekwencji łącznikowych obecnych w ich systemach CRISPR [3].

Kolejnym elementem składowym systemu CRISPR jest sekwencja liderowa o wielkości do 550 par zasad, zlokalizowana bezpośrednio przy końcu 5' pierwszego powtórzenia (Rys. 1). Sekwencja ta jest bogata w pary AT i nie zawiera, podobnie jak proste powtórzenia, otwartych ramek odczytu; podzielone są natomiast zdania na temat stopnia jej konserwatywności w traktach CRISPR różnych gatunków prokariotów [17, 19,

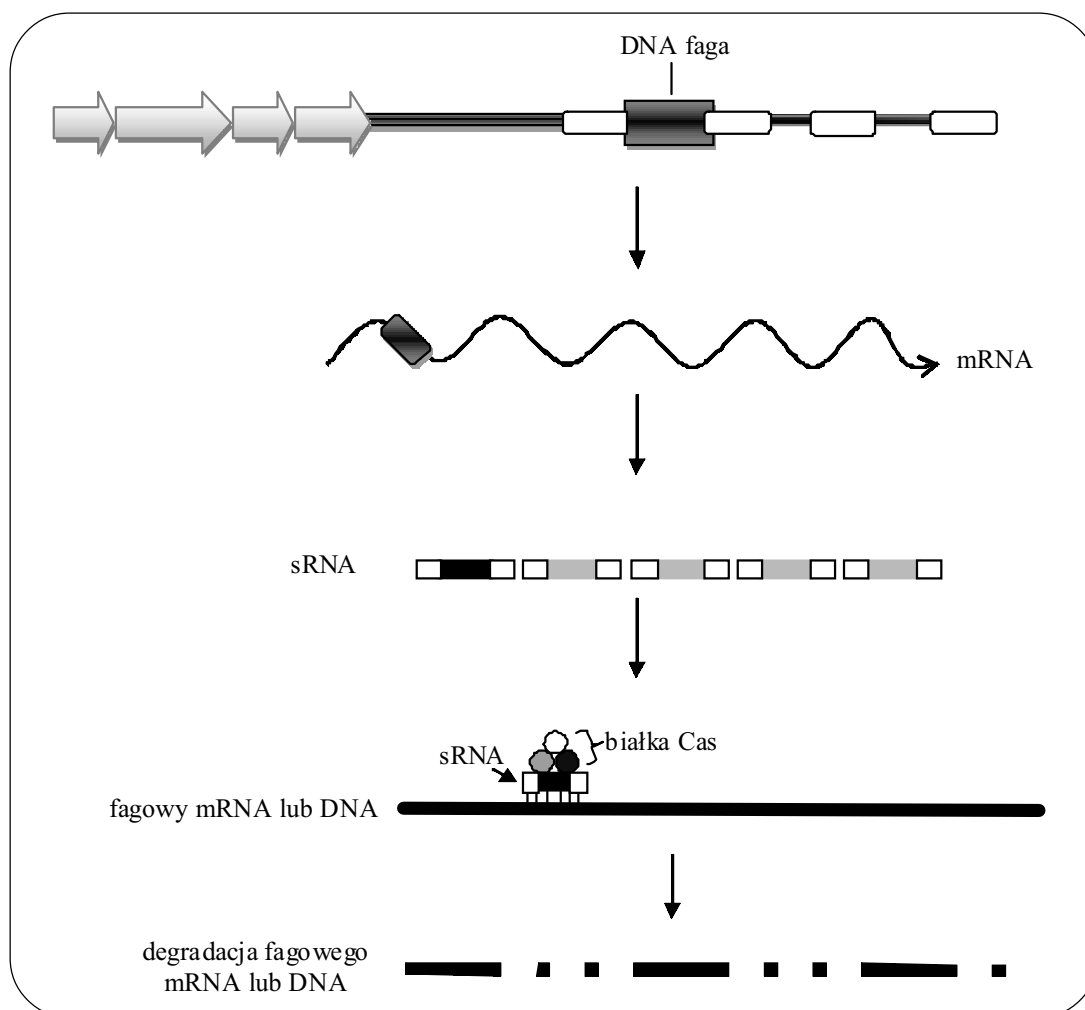
21, 31]. Interesującym jest odkrycie, że wbudowanie w dany trakt CRISPR nowej jednostki, proste powtórzenie-sekwencja łącznikowa (*DR-spacer*), następuje zawsze pomiędzy sekwencją liderową a pierwszym powtórzeniem, co wskazuje na jej funkcję akceptorową w tym procesie. Z racji lokalizacji tej sekwencji sugeruje się również jej funkcję jako promotora dla transkrypcji całego ciągu sekwencji CRISPR [1, 30, 34, 35].

Bezpośrednio przy końcu 5' sekwencji liderowej leżą niedawno odkryte, a ostatnio lepiej scharakteryzowane geny *cas* (Rys. 1). Najogólniej można stwierdzić, że rodzina genów *cas* obejmuje obecnie 7–8 różnych typów, a wśród nich najbardziej rozpowszechnionych jest 6, od *cas1* do *cas6* [13, 33]. W białkach kodowanych przez geny *cas* zidentyfikowano ważne funkcjonalne domeny jak egzo- i endonukleaz, helikaz, a także domeny odpowiedzialne za wiązanie RNA i DNA oraz domeny zaangażowane w regulację transkrypcji [17, 18]. Warto w tym miejscu podkreślić, że sekwencja nukleotydowa genu *cas1* (kod dostępu COG1518) jest powszechnie wykorzystywana jako uniwersalny marker dla badań poznawczych bakteryjnych systemów CRISPR [9, 13, 23]. Inną rodziną białek, syntetyzowanych wyłącznie przez bakterie zawierające szlaki CRISPR, są białka związane prawdopodobnie z funkcją tych systemów. Nie jest znana, jak dotychczas, rola biologiczna tych białek, zwanych RAMP (*repeat associated mysterious protein*), wiadomo jednakże, że geny kodujące syntezę tych białek nie są zlokalizowane w bezpośrednim sąsiedztwie ciągów sekwencji CRISPR [13, 22].

3. System CRISPR-CAS analogiem systemu interferencyjnego RNA eukariotów

Wyniki najnowszych prac, opublikowanych w ubiegłym roku [1, 8] wywołały żywą dyskusję wśród specjalistów na temat funkcji biologicznych systemu CRISPR oraz mechanizmu jego działania w obronie bakterii przed infekcją fagami, a także w regulacji innych procesów komórkowych [20]. Badania przeprowadzono na modelu *Streptococcus thermophilus*, gatunku bakterii powszechnie stosowanych w przemyśle mleczarskim do produkcji jogurtu i serów.

W wyniku infekcji jednego ze szczepów dwoma różnymi fagami udało się wyselekcjonować z hodowli 9 mutantów bakterii opornych na dalszą infekcję tymi fagami. Genomowy DNA tych mutantów poddano sekwencjonowaniu, koncentrując szczególną uwagę na szlaku CRISPR. Stwierdzono, że każdy z tych mutantów w czasie infekcji nabył od 1 do 3 nowych sekwencji łącznikowych, wbudowanych precyzyjnie pomiędzy sekwencją liderową i pierwszy DR. Co więcej, okazało się, że nabyte, nowe sekwencje łącznikowe pochodzą z fagów użytych do infekcji. Dalsze doświadczenia



Rys. 2. Molekularny mechanizm funkcjonowania układu CRISPR-CAS w obronie komórek bakteryjnych przed infekcją fagową (szczegółowe wyjaśnienia w tekście)

oraz dokładniejsze analizy molekularne dowiodły, po pierwsze, że u mutantów opornych na nową infekcję fagową nabyta sekwencja łącznikowa wykazuje 100% homologii z odpowiednim regionem DNA użytego faga, i po drugie, że w przypadku gdy w nabytej sekwencji łącznikowej pojawia się od 1 do kilku mutacji (substytucji), to komórka pozostaje wciąż wrażliwa na infekcję. Ostatecznym potwierdzeniem były wyniki doświadczeń, w których nową, nabytą sekwencję łącznikową mutantu opornego na infekcję wklonowano w ten sam *locus* szczepu wrażliwego i stwierdzono, że nabył on oporność na badanego faga (Rys. 2). I odwrotnie, delekcja tej sekwencji w szczepie opornym na infekcję czyniła go ponownie wrażliwym. Nieoczekiwanie okazało się, że niewielka populacja izolowanych w czasie doświadczeń fagów zachowała zdolność infekowania szczepów *S. thermophilus*. Udało się jednak dowieść, że w DNA części z tych fagów pojawiły się mutacje w rejonie tej sekwencji, która w czasie infekcji jest przenoszona do CRISPR bakterii, zaś w niektórych innych nabyta sekwencja wykazywała,

co prawda, 100% homologię z odpowiednim regionem DNA faga, ale mutacje zidentyfikowano w motywie AGAA przylegającym do jej końca 3'. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze sugestie o roli tego motywu w rozpoznawaniu przez faga traktu CRISPR. Ustalenie organizacji systemu CRISPR na poziomie DNA nie wyjaśniało mechanizmu jego działania, w tym udziału określonych białek komórkowych, w szczególności białek CAS i ich specyficznych funkcji. Autorzy wyżej cytowanych prac w jednym z wyselekcjonowanych szczepów opornych na infekcję fagową zainaktywowali gen *cas5*, w drugim zaś gen *cas7*. W pierwszym przypadku inaktywacja genu, kodującego syntezę endonukleazy, doprowadziła do utraty oporności na infekcję fagową, w drugim zaś przypadku inaktywacja genu o bliżej nieznannej funkcji, nie miała wpływu na zmianę oporności szczepu na ponowną infekcję tym samym fagiem, ale osłabiała jego zdolność do nabywania oporności na infekcję innym fagiem. Postawiono wniosek, że produkt tego nieznanego genu jest odpowiedzialny za wbudowywanie do traktu CRISPR określ-

lonych fragmentów DNA faga jako nowych, kolejnych sekwencji łącznikowych [1, 8, 13]. Co prawda, molekularny mechanizm odpowiedzialny za aktywność biologiczną układu CRISPR jest jeszcze daleki od pełnego wyjaśnienia, ale w świetle wyżej omówionych wyników, a także nieco wcześniejszych danych [34, 35], wskazujących, że u szczepów z rodzaju *Archaeoglobus* i *Sulfolobus* trakty CRISPR podlegają transkrypcji w całości, z jednego promotora, można było zaproponować ogólny model dla wyjaśnienia funkcjonowania całego systemu. Wykazano, że transkrypty podlegają w komórkach enzymatycznej obróbce z wytworzeniem cząsteczek małych sRNA (*small RNA*), o wielkości równej jednej sekwencji DR plus sekwencja łącznikowa, a trawienie transkryptu ma miejsce w środku każdej jednostki DR. Stąd, końcowe produkty sRNA zawierają pełną sekwencję łącznikową w środku i połowy sąsiadujących sekwencji DR zlokalizowanych na ich końcach 5' i 3'. Wiadomo, że obecność w sekwencjach DR motywu palindromów umożliwia tworzenie drugorzędowych struktur i wypełnienia sekwencji łącznikowych. Fakt, że transkrypty traktów CRISPR są trawione do krótkich sRNA, a w proces ten zaangażowane są domeny białek CAS, stał się podstawą do sformułowania hipotezy, że bakteryjny system CRISPR jest funkcjonalnym analogiem systemu siRNAs (ang. *small interference RNA*) organizmów eukariotycznych [23], który spełnia ważną rolę jako system obrony komórki przed RNA wirusów i transpozonów [14, 32]. Zgodnie z tą hipotezą, bakteryjne siRNAs, krótkie produkty trawienia transkryptu CRISPR, są analogami eukariotycznych siRNA. Tworzą one bowiem kompleksy z białkami CAS, podobnie jak siRNAs eukariontów z białkiem Dicer, i rozpoznają homologiczne sekwencje w syntetyzowanych przez obce elementy genetyczne transkryptach, prowadząc w końcowym efekcie do ich sukcesywnej degradacji przez inne białka CAS (Rys. 2).

Ostatnio przeprowadzono niezwykle owocne badania aktywności systemu CRISPR na modelu genetycznie rekonstruowanych szczepów pochodnych *E. coli* K12 wrażliwych na infekcję fagiem λ [4]. W genomie tego gatunku znajduje się zarówno trakt powtórzonych sekwencji DR-sekwencja łącznikowa, jak i 8 genów *cas* : *cas3*, *cas1*, *cas2*, kodujących, odpowiednio, HD-nukleazę/helikazę, integrazę, endorybonukleazę, i 5 genów oznaczonych *casABCD*, kodujących kompleks białek systemu CRISPR odpowiedzialnego za ochronę komórek przed infekcją fagową, nazwanym CASCADE (*CRISPR-associated complex for antiviral defense*) (Rys. 1B). Autorzy cytowanej pracy skonstruowali różne rekombinowane szczepy. Jedne z nich nosiły jeden fragment DNA faga λ , komplementarny do DNA czterech genów niezbędnych dla rozwoju faga, wklonowany pomiędzy pierwszy i drugi motyw

DR traktu CRISPR. W inne skonstruowane szczepy wklonowano cztery fragmenty DNA faga. Jeszcze inne, pozbawione traktu DR-sekwencja łącznikowa, nosiły geny *cas*, ale aktywne tylko w określonych kombinacjach (*cascade*, *cas3*, *cascade+cas3*, *cascade-casE+cas3*, *cascade+cas1+cas2*, *cascade+cas3*, *cas1+cas2*). Nie wnikając w metodyczne szczegóły przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że wklonowanie fragmentów DNA faga λ w region traktu CRISPR wrażliwego szczepu *E. coli* K12 pozwoliło wyselekcjonować szczepy 10 milionów razy bardziej odporne na infekcję tym fagiem, iż szczep wyjściowy. Zidentyfikowano i scharakteryzowano również kompleks białkowy CASCADE i udowodniono jego bezpośredni udział w degradacji mRNA regionu CRISPR, z wytworzeniem fragmentów o długości 57 nukleotydów CRISPR-RNA. Każdy z tych fragmentów zawierał sekwencję łącznikową otoczoną na końcach 5' i 3' fragmentami przylegających sekwencji DR. Pełna efektywność kompleksu CASCADE była zapewniona w obecności białka Cas3. Ustalono także niezwykle specyficzną specyficznosc kompleksu CASCADE w skonstruowanym szczepie *E. coli* K12 opornym na faga wykazując, że nie jest on aktywny w stosunku do transkryptów innych CRISPR, w którym znajdują się sekwencje DR z innych szczepów *E. coli*. Co więcej, udało się udowodnić, że aktywność systemu CRISPR zapewniają transkrypty zarówno nici sensu jak i antysensu wklonowanych fragmentów DNA faga λ . Wyniki te wskazują, że docelowym elementem dla małych CRISPR-RNA może być także DNA faga. Zatem fundamentalna różnica pomiędzy bakteryjnym i eukariotycznym systemem obrony przed infekcją obcym DNA polega na tym, że w pierwszym przypadku degradacji ulega DNA w drugim zaś komplementarny RNA.

Można obecnie oczekiwać, że w najbliższej przyszłości zostaną wyjaśnione kolejne pytania i wątpliwości dotyczące systemu CRISPR-CAS, a w tym w szczególności regulacji transkrypcji regionu CRISPR, regulacji ekspresji białek CAS i ich składania w komórce w postaci kompleksu CASCADE, a także enzymatycznych mechanizmów degradacji mRNA-CRISPR oraz degradacji docelowych sekwencji DNA fagów. Nie wiadomo jeszcze w jaki sposób sekwencje fagów są *in vivo* selekcjonowane, wycinane i wbudowywane w trakty CRISPR jako sekwencje łącznikowe. Nie wyklucza się, że system CRISPR-CAS może być zaangażowany w wyciszanie także endogennych genów bakterii, bowiem 7–35% sekwencji łącznikowych w traktach CRISPR ma chromosomalne pochodzenie [1, 3, 26].

W świetle omawianych wyżej wyników można lepiej zrozumieć równowagę biologiczną pomiędzy bakteriami i szeroko rozpowszechnionymi w środowiskach naturalnych bakterii fagami. Szacuje się, że co dwa dni około połowa populacji bakterii żyjących w biosferze

jest zabijana w wyniku infekcji różnymi fagami. Bakterie są jednak wyposażone w różne naturalne mechanizmy obrony przed fagami jak: blokowanie ich adsorpcji, trawienie fagowego DNA restryktazami oraz degradacja obcego DNA przy udziale szeroko rozpowszechnionego systemu CRISPR-CAS. Sugeruje się, że być może, zostaną wykryte również fagowe białka specyficznie blokujące system CRISPR-CAS, co w świetle wyników opisanych przez dla białek *Sulfolobus* ma pewne uzasadnienie [29]. Z drugiej strony, wysokie tempo mutacji fagów pozwala na generowanie mutantów zdolnych do przełamania mechanizmów obronnych komórki, zaś selekcyjna presja bakteryjnych systemów obrony, nadają tej równowadze bardzo dynamiczny charakter, zarówno w aspekcie ekologicznym jak i ewolucyjnym.

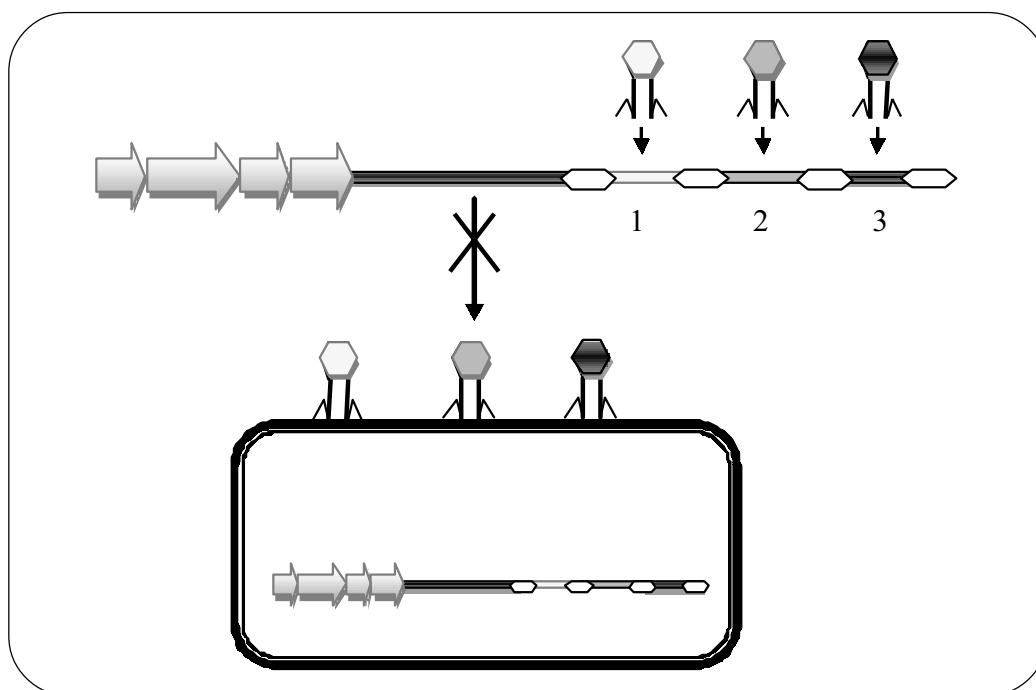
4. Możliwości praktycznych zastosowań systemu CRISPR-CAS

Wiele gałęzi przemysłu spożywczego, farmaceutycznego wykorzystuje bakterie w procesach biotechnologicznych, a stąd ochrona przed infekcjami fagowymi czystych kultur bakterii, wykorzystywanych w różnych procesach biotechnologicznych, ma ogromne znaczenie praktyczne i ekonomiczne. Dla przykładu, infekcja fagami szczepów wykorzystywanych w przemyśle mleczarskim w produkcji napojów mlecznych i serów jest przyczyną ogromnych problemów

i strat finansowych [33]. Fagi replikują się w bakteriach bardzo szybko, a stąd pełna liza hodowli bakteryjnych następuje w czasie kilku godzin. Ustalono, że dodanie do hodowli *E. coli* o gęstości 10^6 komórek/ml 1 cząstki faga T7 prowadzi w krótkim czasie do pełnej lizy 99,9% komórek oraz syntezy 10^9 nowych cząstek fagowych.

Ustalenie organizacji i funkcji biologicznej systemu CRISPR-CAS stworzyło obecnie realną szansę zarówno dla selekcji szczepów przemysłowych opornych na określone fagi jak i konstrukcji takich szczepów dostępnymi metodami genetycznymi. Klonowanie określonych fragmentów DNA różnych fagów w trakty CRISPR szczepów wrażliwych i selekcjonowanie szczepów opornych na infekcje nie nastęrcza obecnie żadnych problemów technicznych (Rys. 3). Jednak regulacje prawne, szczególnie w krajach Europy, dotyczące genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów (GMO), praktycznie nie dopuszczają do ich stosowania na skalę przemysłową w przemyśle spożywczym. Jednak w tym przypadku można z powodzeniem selekcjonować takie szczepy także poprzez infekcję szczepów przemysłowych różnymi naturalnymi fagami oraz poszukiwanie szczepów opornych, które nabyły i stabilnie wbudowały w trakty CRISPR określone fragmenty DNA fagów na drodze naturalnej.

Podobieństwo bakteryjnego systemu CRISPR-CAS do eukariotycznego systemu RNAi nasuwa możliwość jeszcze innych zastosowań. Eukariotyczny system interferencyjnego RNA spełnia nie tylko funkcję obrony



Rys. 3. Możliwe sposoby konstrukcji szczepów opornych na infekcję fagową

1, 2, 3, odpowiednio, fragmenty DNA trzech różnych fagów wklonowanych jako sekwencje łącznikowe w trak CRISPR. Alternatywnie, sposób naturalnej selekcji komórek bakterii opornych na infekcję po kolejnych cyklach litycznych fagami 1, 2, 3.

komórki przed obcym DNA (RNAi), ale także reguluje ekspresję endogennych genów chromosomalnych (micro-RNAs). Nie jest wykluczonym, że zgromadzona wiedza na temat systemu CRISPR-CAS może pozwolić na opracowanie sposobu hamowania ekspresji endogennych genów prokaryotów, przydatnego nie tylko dla badań poznawczych, ale także praktycznego wykorzystania w wyciszaniu genów odpowiedzialnych za patogenezę.

Wspominano wcześniej, że loci CRISPR w świecie bakterii są bardzo zróżnicowane zarówno pod względem liczby powtórzeń DR oraz ich sekwencji nukleotydowej, jak i obecności różnorodnych sekwencji łącznikowych. U niektórych gatunków trakt CRISPR jest zróżnicowany nawet u bardzo blisko spokrewnionych szczepów pod względem innych wyznaczników genetycznych. Jednym z przykładów są szczepy *Leptospirillum* charakteryzujące się dużym, klonalnym zróżnicowaniem tego traktu. [36]. Innym przykładem jest gatunek *Mycobacterium tuberculosis*, w obrębie którego szczepy są bardzo zróżnicowane pod względem zarówno liczby sekwencji łącznikowych jak i ich sekwencji nukleotydowych. Wiedza ta stała się podstawą do opracowania szeroko już stosowanej metody genotypowania izolatów *M. tuberculosis* dla celów szybkiej i pewnej diagnostyki oraz dochodzeń epidemiologicznych zakażeń gruźliczych [5, 7].

Z racji faktu, że nowe sekwencje łącznikowe są wbudowywane z reguły pomiędzy pierwszym i drugim powtórzeniem traktu CRISPR można sądzić, że sekwencje łącznikowe coraz bardziej oddalone od sekwencji liderowej mają, odpowiednio, coraz starsze pochodzenie ewolucyjne. Stąd, te pierwsze są unikatowe dla poszczególnych szczepów, natomiast sekwencje starsze ewolucyjnie mogą być wspólne dla wielu izolatów w obrębie gatunku a nawet różnych gatunków [30]. Zatem obecność różnych sekwencji łącznikowych, specyficznych dla poszczególnych szczepów w obrębie określonego gatunku oraz specyficznych dla różnych gatunków w obrębie rodzajów, może stanowić bardzo dobry marker dla ustalania filogenetycznych pokrewieństw i przydatny także w taksonomii bakterii.

Piśmiennictwo

1. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Moineau S., Romero D.A., Horvath P.: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709–1712 (2007)
2. Bland C., Ramsey T.L., Sabree F., Lowe M., Brown K., Kyrioples N.C., Hugenholtz P.: CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly palindromic repeats. *BMC Bioinformatics*, **8**, 209 (2007)
3. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D.: Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, **151**, 2551–2561 (2005)
4. Brouns S.J.J.: Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, **321**, 960 (2008)
5. Brudey K., Driscoll J.R. i wsp. (cytowana praca jest dziełem 66 autorów): *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* **6**, 23 (2006)
6. Bult C. J., White O. i wsp. (cytowana praca jest dziełem 23 autorów): Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, **273**, 1058–1073 (1996)
7. Crawford J.T.: Genotyping in contact investigations: a CDC perspective. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **7**, S453–S457 (2003)
8. Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonte J., Fremux C., Boyaval P., Romero D.A., Horvath P., Moineau S.: Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **190**, 1390–1400 (2008)
9. Ebihara A., Yao M., Ryoji M., Isao T., Shigeyki Y., Seiki K.: Crystal structure of hypothetical protein TTHB192 from *Thermus thermophilus* HB8 reveals a new protein family with an RNA recognition motif-like domain. *Protein Sci.* **15**, 1494–1499 (2006)
10. Edgar R.C.: PILER-CR: fast and accurate identification of CRISPR repeats. *BMC Bioinformatics*, **8**, 18 (2007)
11. Godde J.S., Bickerton A.: The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J. Mol. Evol.* **62**, 718–729 (2006)
12. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C.: The CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, **8**, 172 (2007)
13. Haft D.H., Selengut J., Mongodin E.F., Nelson K.E.A.: A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* **1**, e60 (2005)
14. Hannon G.J.: RNA interference. *Nature*, **418**, 244–251 (2002)
15. Hermans P., van Soolingen D., Bik E.M., de Haas P.E., Dale J.W., van Embaden J.D.: Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* **59**, 2695–2705 (1991)
16. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A.: Nucleotide sequence of the *iap* gene responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–5433 (1987)
17. Jansen R., van Embaden J.D., Gaastra W., Schouls L.M.: Identification of a novel family sequence repeats among prokaryotes. *OMICS*, **6**, 23–33 (2002)
18. Jansen R., van Embaden J.D., Gaastra W., Schouls L.M.: Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**, 1565–1575 (2002)
19. Klenk H.P.: The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, **390**, 364–370 (1997)
20. Kunin V., Sorek R., Hugenholtz P.: Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol.* **8**, R61 (2007)
21. Lillestol R.K., Redder P., Garret R.A., Brüger K.: A putative viral defense mechanisms in archeal cells. *Archea*, **2**, 59–72 (2006)

22. Makarova K.S., Aravind L., Grishin N.V., Rogozin I.B., Koonin E.V.A.: DNA repair system specific for thermophilic Archea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res.* **30**, 482–498 (2002)
23. Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin E.V.A.: A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct.* **1**, 7 (2007)
24. Mojica F.J., Ferrer C., Juez G., Rodriguez-Valera F.: Long stretches of hord tandem repeats are present in the largest replicons of the Archea *Haloferax mediterranei* an *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol. Microbiol.* **17**, 85–93 (1995)
25. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Soria E., Juez G.: Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* **36**, 244–246 (2000)
26. Mojica F.J., Diez-Villaasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E.: Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–182 (2005)
27. Nakata A., Amemura M., Makino K.: Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol.* **171**, 3553–3556 (1989)
28. Nelson K., Clayton R.A. i wsp.(cytowana praca jest dziełem 29 autorów): Evidence for lateral gene transfer between Archea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, **399**, 323–329 (1999)
29. Peng X., Brugger K., Shen B., Chen L., She Q., Garrett R.A. Genus-specific protein binding to the large clusters of DNA repeats (short regularly spaced repeats) present in Sulfolobus genomes. *J. Bacteriol.* **185**, 2410–2417 (2003)
30. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G.: CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, **151**, 653–663 (2005)
31. Smith D.R., Doucette-Stamm L.A. i wsp. (cytowana praca jest dziełem 25 autorów): Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**, 7135–7155 (1997)
32. Sontheimer E.J.: Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 127–138 (2005)
33. Sturino J.M., Klaenhammer T.R.: Engineered bacteriophage-defence system in bioprocessing. *Nature Rev. Microbiol.* **4**, 395–404 (2006)
34. Tang T. H., Bachelierie J.P., Rozhdestvensky T., Bortolin M.L., Huber H., Drungowski M., Elge T., Brosius J., Huttenhofer A.: Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7536–7541 (2002)
35. Tang T.H., Polacek N., Zywicki M., Huber H., Brugger K., Garrett R., Bachelierie J.P., Hittenhofer A.: Identification of a novel non-coding RNAs as potential antisense regulators in the archeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Microbiol.* **55**, 469–481 (2005)
36. Tyson G.W., Banfield J.F.: Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environ. Microbiol.* **10**, 200–207 (2008)
37. Young R.F. III: Secret Weapon. *Science*, **321**, 922–923 (2008)

WYSTĘPOWANIE PIERWOTNEJ OPORNOŚCI *HELICOBACTER PYLORI* NA LEKI PRZECIWBAKTERYJNE W POLSCE I NA ŚWIECIE

Elżbieta Karczevska*, Izabela Wojtas, Alicja Budak

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Wpłynęło w styczniu 2008 r.

1. Wprowadzenie. 2. Leczenie zakażenia *H. pylori*. 3. Mechanizmy oporności *H. pylori* na rekomendowane w leczeniu zakażenia antybiotyki i chemioterapeutyki. 4. Występowanie oporności *H. pylori* na leki przeciwbakteryjne. 4.1. Oporność *H. pylori* na metronidazol. 4.2. Oporność *H. pylori* na klarytromycynę. 4.3. Szczepy *H. pylori* o podwójnej oporności. 4.4. Oporność *H. pylori* na amoksyycylinę. 4.5. Oporność *H. pylori* na tetracyklinę. 5. Nowe koncepcje leczenia zakażenia *H. pylori*. 6. Podsumowanie

Prevalence of *Helicobacter pylori* primary resistance to antimicrobial agents in Poland and around the world

Abstract: Since the association between *Helicobacter pylori* infection and inflammation or ulceration of the stomach and duodenum has been proved, antimicrobial agents have become indispensable in the treatment of most gastroduodenal diseases. However, the widespread use of antibiotics and chemotherapeutics contributed to the development of resistance among clinical *H. pylori* strains which is the main factor compromising the efficacy of eradication therapy. This review summarizes recent data concerning the resistance mechanisms of *H. pylori*, prevalence of primary resistance to antimicrobial agents (metronidazole, clarithromycin, tetracycline and amoxicillin) in adult population in Poland and in different parts of the world as well as the application of alternative treatment for *H. pylori* infections, showing at the same time the scale of the problem connected with their eradication.

1. Introduction. 2. Treatment of *H. pylori* infection. 3. *H. pylori* resistance mechanisms to antibiotics and chemotherapeutics recommended for treatment of infections. 4. Prevalence of *H. pylori* resistance to antimicrobial agents. 4.1. Resistance of *H. pylori* to metronidazole. 4.2. Resistance of *H. pylori* to clarithromycin. 4.3. Double resistant *H. pylori* strains. 4.4. Resistance of *H. pylori* to amoxicillin. 4.5. Resistance of *H. pylori* to tetracycline. 5. New concepts in treatment of *H. pylori* infections. 6. Summary

Słowa kluczowe: antybiotyki, chemioterapeutyki, *Helicobacter pylori*, leczenie, oporność

Keywords: antibiotics, chemotherapeutics, *Helicobacter pylori*, treatment, resistance

1. Wprowadzenie

Zakażenie *Helicobacter pylori* jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych zakażeń bakteryjnych na świecie. Szacuje się, że około 50% ludności całego świata jest zakażone tą bakterią [10, 30]. Nabycie zakażenia najczęściej związane jest z wiekiem dziecięcym, warunkami socjoekonomicznymi oraz sanitarnymi. W krajach rozwijających się częstość zakażeń wynosi od 80% do 100%, natomiast w krajach rozwiniętych (Australia, Ameryka Północna, Europa Zachodnia) od 20% do 40% [18, 59]. Jak wynika z wielośrodkowych badań przeprowadzonych w Polsce, w latach 2000–2003 odsetek zakażeń wywołanych przez *H. pylori* był wysoki i sięgał około 58% (dorośli – 84%, dzieci do 18 roku życia – 32%) [46].

Przyjmuje się, że głównym rezerwuarem bakterii jest człowiek, a zakażenie szerzy się przez kontakty międzyludzkie [37]. W krajach uprzemysłowionych do zakażenia dochodzi najczęściej na drodze ustno-pokarmowej, a w krajach o niskim poziomie socjoekonomicz-

nym na drodze kałowo-pokarmowej [15]. Jest możliwa także droga ustno-ustna, ze względu na przejściową kolonizację jamy ustnej przez ten drobnoustrój [31]. Obecność *H. pylori* w ślinie, stwarza prawdopodobnie główne źródło szerzenia się zakażenia wśród małych dzieci [18].

Jak wiadomo, *H. pylori* odgrywa znaczącą rolę w etiopatogenezie schorzeń górnego odcinka przewodu pokarmowego. Jest czynnikiem etiologicznym zapalenia błony śluzowej żołądka typu B oraz jednym z istotnych czynników ryzyka choroby wrzodowej, chłoniaka żołądka typu MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) oraz raka żołądka [2, 13, 32]. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, że u większości zakażonych, poza zmianami histologicznymi o typie przewlekłego zapalenia żołądka, nie dochodzi do zmian w jego czynności [44]. Jedynie u około 15% zakażonych *H. pylori*, rozwija się wrzód trawienny (u 90% wrzód dwunastnicy, natomiast u 70% wrzód żołądka), a u 2% może dojść do rozwoju raka żołądka [73]. Znacznie rzadziej notuje się występowanie chłoniaka typu MALT lub choroby Menetriera.

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel./faks: (012) 659 12 71, e-mail: elzbieta.karczevska@uj.edu.pl

2. Leczenie zakażenia *H. pylori*

Do czasu wykrycia związku pomiędzy chorobą wrzodową a zakażeniem *H. pylori*, leczenie wrzodów polegało na stosowaniu środków silnie hamujących wydzielanie żołądkowe, takich jak inhibitory pompy protonowej (PPI – proton pump inhibitor) lub antagoniści receptorów histaminowych H_2 , które skutecznie goiły wrzody, ale nie eliminowały infekcji. Dopiero odkrycie Warrena i Marshalla potwierdziło związek pomiędzy zakażeniem *H. pylori* a chorobą wrzodową oraz przyczyniło się do wprowadzenia leków przeciwbakteryjnych w terapii zakażenia [50]. Wykazano, że skuteczność eradykacji *H. pylori* (brak obecności bakterii w błonie śluzowej żołądka co najmniej cztery tygodnie po zakończeniu leczenia) w wyniku stosowania tylko jednego leku jest niska [17]. Stąd zaczęły pojawiać się różne propozycje terapii wielolekowej.

Opracowaniem metod skojarzonego leczenia farmakologicznego zakażeń *H. pylori* zajmuje się grupa międzynarodowych ekspertów (EHSG – European Helicobacter Study Group) oraz grupy robocze. Wytyczne obowiązujące w Europie, dotyczące postępowania w tych zakażeniach, są publikowane jako „Konsensus Maastricht” [23, 47, 48]. W Polsce obowiązują zalecenia Grupy Roboczej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii (PTG) [18]. Obejmują one diagnostykę oraz leczenie zakażeń *H. pylori*.

Zgodnie z najnowszymi zaleceniami Grupy Roboczej PTG oraz Raportu Maastricht-3 2005, wskazaniem do eradykacji *H. pylori* jest [17, 18, 58, 63]:

- choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy,
- chłoniak MALT,
- zanikowe zapalenie żołądka,
- przebyta operacja z powodu raka żołądka,
- rak żołądka u krewnych pierwszego stopnia¹,
- życzenie pacjenta po konsultacji z lekarzem,
- niedokrwistość z niedoboru żelaza o niewyjaśnionej przyczynie,
- przewlekła samoistna płamica małopłytkowa.

Obecnie za najbardziej skuteczne postępowanie terapeutyczne, które daje najwyższy odsetek eradykacji *H. pylori*, uważa się terapię, obejmującą lek zmniejszający wydzielanie żołądkowe (inhibitor pompy protonowej – PPI) w połączeniu z dwoma antybiotykami (amoksycylina, klarytromycyna, rzadziej tetracyklina) lub antybiotykiem i jednym z chemioterapeutyków (metronidazol, tynidazol) [17].

Inhibitory pompy protonowej (PPI) (omeprazol, pantoprazol, lanzoprazol, rabeprazol, esomeprazol) są lekami, które hamując wydzielanie kwasu solnego, przez blokowanie pompy wodorowo-potasowej w ko-

mórkach okładzinowych żołądka, podwyższają pH w żołądku, co zwiększa skuteczność działania antybiotyków oraz wpływa korzystnie na proces gojenia się wrzodów. Wpływają także na zmniejszenie objętości soku żołądkowego, co prowadzi do wzrostu stężenia antybiotyków [5, 72].

Jak podaje piśmiennictwo, bezpośrednie działanie wobec *H. pylori* wykazuje jedynie omeprazol, który hamuje wzrost bakterii oraz może blokować aktywność bakteryjnej ureazy [34].

Antagoniści receptorów H_2 (ranitydyna, cymetydyna, famotydyna), to leki, których mechanizm działania polega na wiązaniu się z receptorem histaminowym typu 2 i hamowaniu wydzielania jonów wodorowych przez komórki okładzinowe żołądka. Ze względu na małą skuteczność w terapii eradykacyjnej, w porównaniu do schematów leczenia z PPI, nie są one zalecane w leczeniu zakażenia *H. pylori* [18, 72].

Sole bizmutu, to leki działające cytoprotekcyjnie w stosunku do błony śluzowej żołądka, wpływające jednocześnie na gojenie się niszy wrzodowej oraz wykazujące działanie aktywne wobec *H. pylori*. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego polega na hamowaniu aktywności enzymów proteolitycznych oraz zaburzeniu adhezji bakterii do komórek nabłonkowych błony śluzowej żołądka. Wskutek opłaszczenia solami bizmutu pałeczek *H. pylori* dochodzi do ich obumierania [5, 34, 62, 72]. Raport z Maastricht-2 2000 oraz wytyczne amerykańskie uwzględniały w terapii eradykacyjnej preparat stanowiący połączenie antagonisty receptorów H_2 (ranitydyny) z cytrynianem bizmutu (RBC – ranitidine bismuth citrate), jako środek o działaniu równorzędnym z PPI [35, 48]. Obecnie, Grupa Robocza PTG oraz Europejski Konsensus Maastricht-3 2005 nie zalecają stosowania tego leku w terapii zakażenia *H. pylori* [17].

Rekomendowane w eradykacji zakażenia *H. pylori* antybiotyki i chemioterapeutyki charakteryzują się dobrą dyspersją w żołądku i dwunastnicy, zdolnością penetracji do śluzu, absorpcją do błony śluzowej oraz wysoką aktywnością bakteriobójczą w stosunku do *H. pylori* [5].

Amoksycylina – półsyntetyczna penicylina, działająca bakteriobójczo wobec wielu gatunków bakterii. Blokuje ostatni etap biosyntezy ściany komórkowej bakterii poprzez wiązanie się z karboksypeptydazami i transpeptydazami (tzw. białka wiążące penicyliny – PBPs – penicillin binding proteins). Jest stosowana w eradykacji *H. pylori* w skojarzeniu z klarytromycyną lub metronidazolem. Wykazuje oporność na działanie soku żołądkowego [20, 28].

Klarytromycyna – antybiotyk z grupy makrolidów – bakteriostatycznych inhibitorów syntezy białek bakteryjnych. Miejscem docelowym działania klarytromycyny jest pojednostka 23S rRNA rybosomu

¹ W Polsce zaleca się eradykację zakażenia *H. pylori* już w drugim stopniu pokrewieństwa [18].

komórki bakteryjnej. Antybiotyk ten jest najczęściej stosowany w eradykacji *H. pylori* w połączeniu z metronidazolem lub amoksycyliną. Wykazuje trwałość w środowisku kwaśnym [20].

Tetracyklina – antybiotyk o działaniu bakteriostatycznym, charakteryzującym się szerokim spektrum działania, obejmującym także *H. pylori*. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego polega na wiązaniu się leku z podjednostką 16S rRNA rybosomu, co uniemożliwia wiązanie aminoacylo-tRNA do miejsca A na rybosomie. Prowadzi to do zahamowania syntezy białek i wzrostu bakterii. Jest stosowana w terapii zakażeń szczepami *H. pylori* opornymi na inne leki, takie jak klarytromycyna czy metronidazol. Stanowi także alternatywę w leczeniu osób uczulonych na penicyliny [16, 20].

Metronidazol – chemioterapeutyk wykazujący działanie bójcze w stosunku do bakterii beztlenowych, mikroaerofilnych oraz pierwotniaków. Po wnikięciu do wnętrza komórki bakteryjnej ulega redukcji (za pośrednictwem m.in. nitroreduktazy niezależnej od tlenu NADPH-RdxA oraz oksydoreduktazy flawinowej NAD(P)H-FrxA) przy niskim potencjale oksydoredukcyjnym, a jego zredukowana forma powoduje rozrywanie nici DNA, prowadząc do śmierci komórki. Metronidazol wykazuje synergizm z antybiotykami beta-laktamowymi (amoksycyliną). Stanowi jeden z najbardziej aktywnych preparatów w leczeniu zakażeń bakteriami beztlenowymi [20].

Aktualnie, w Polsce, zgodnie z wytycznymi PTG (2004 rok), obowiązuje następujący schemat leczenia zakażenia *H. pylori* [18]:

7-dniowa terapia pierwszego rzutu:

- PPI + amoksycyлина (1000 mg 2 razy/dobę) + klarytromycyna lub metronidazol² (500 mg 2 razy/dobę). W przypadku braku efektów terapeutycznych po zastosowaniu terapii pierwszego rzutu zalecany jest: 7- lub 10- dniowy trójskładnikowy schemat leczenia drugiego rzutu:
- PPI + 2 antybiotyki³, lub czteroskładnikowy;
- PPI + cytrynian bizmutu + 2 antybiotyki lub:
- PPI + cytrynian bizmutu + tetracyklina 500 mg (4 razy/dobę) + metronidazol (500 mg 3 razy/dobę).

Leczenie trzeciego wyboru:

Według zaleceń PTG oraz Raportu Maastricht-3 2005, po dwukrotnym niepowodzeniu terapii oraz przy

bezwzględnych wskazaniach do eradykacji *H. pylori* (m.in. choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy i jej powikłania, chłoniak żołądka typu MALT), chorego należy skierować do specjalistycznego ośrodka, wykonać badanie mikrobiologiczne oraz antybiogram dla wyizolowanego szczepu *H. pylori*, a następnie leczyć zgodnie z wynikiem lekowrażliwości [18, 63].

Według najnowszych wskazań, zawartych w Raporcie Maastricht-3 2005, 14-dniowa standardowa terapia trójlekowa pierwszego rzutu (PPI + amoksycyлина + klarytromycyna lub metronidazol) jest skuteczniejsza niż terapia 7-dniowa. Pozostaje ona nadal leczeniem pierwszego wyboru w populacjach, w których częstość oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę jest mniejsza niż 15–20%.

W przypadku, gdy odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol w danej populacji sięga poniżej 40%, akceptuje się terapię złożoną z PPI, klarytromycyny i metronidazolu [63].

Zaleca się ciągle monitorowanie częstości występowania oporności wśród szczepów *H. pylori* na stosowane w leczeniu antybiotyki i chemioterapeutyki w różnych rejonach geograficznych, celem doboru odpowiedniego schematu leczenia przeciwbakteryjnego.

Czteroskładnikowe leczenie z preparatem bizmutu stanowi akceptowaną terapię pierwszego rzutu i nadal pozostaje najlepszym rozwiązaniem leczenia drugiego rzutu. W przypadku braku dostępności soli bizmutu, Raport Maastricht-3 2005 rekomenduje terapię złożoną z PPI, amoksycyliny lub tetracykliny i metronidazolu [63].

3. Mechanizmy oporności *H. pylori* na rekomendowane w leczeniu zakażenia antybiotyki i chemioterapeutyki

Oporność klinicznych szczepów *H. pylori* na antybiotyki i chemioterapeutyki uważana jest za jeden z głównych czynników wpływających na skuteczność terapii eradykacyjnej. Wykazano, że z opornością na klarytromycynę oraz w mniejszym stopniu na metronidazol, związane są niepowodzenia w terapii zawierającej te leki [21]. W przypadku szczepów wrażliwych na klarytromycynę, stopień eradykacji sięga 87,8%. Odnotowano spadek stopnia eradykacji do 18,3%, kiedy szczepy są odporne na ten antybiotyk. Wrażliwość na metronidazol daje sukces terapeutyczny w 97%, a oporność na ten chemioterapeutyk obniża efektywność eradykacji o 25% [53].

Oporność klinicznych szczepów *H. pylori* na leki przeciwbakteryjne wynika przede wszystkim z mutacji punktowych, obejmujących jedną lub kilka par zasad, w obrębie jednego genu.

Obecnie, jednym z najlepiej poznanych mechanizmów oporności *H. pylori* na antybiotyki, jest oporność

² W Polsce, ze względu na występowanie wysokiej oporności szczepów *H. pylori* na metronidazol i klarytromycynę, nie zaleca się stosowania obydwu tych leków jednocześnie. Rekomenduje się schemat zawierający amoksycylinę z metronidazolem lub amoksycylinę z klarytromycyną.

³ Według zaleceń, jeżeli w pierwszym rzucie zastosowano klarytromycynę to w drugim należy wymiennie zastosować metronidazol i odwrotnie.

na klarytromycynę. Powstaje ona w wyniku mutacji punktowej, polegającej na tranzycji adeniny do guaniny (pozycja 2142 lub 2143) lub transwersji adeniny do cytozyny (pozycja 2142), w genie 23S rRNA (mutacje te znajdują się w domenie V 23S rRNA, która ma wpływ na drugorzędową strukturę 23S rRNA) prowadząc do modyfikacji miejsca docelowego, a co za tym idzie zmniejszenia wiązania klarytromycyny do rybosomu [21]. Najczęściej spotykane mutacje to A2143G, A2142G lub A2142C [69]. Ich częstość występowania różni się pod względem geograficznym. Badania przeprowadzone w 12 ośrodkach na całym świecie wykazały, że mutacja A2143G dominuje w szczepach *H. pylori* pierwotnie opornych na klarytromycynę (69,8%) [53].

Obecnie, mutacje te można wykryć stosując metodę PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR), co umożliwia uzyskanie wyniku w ciągu kilku godzin, zanim zostanie wprowadzona terapia eradykacyjna [57].

Jak dotąd, mechanizm oporności *H. pylori* na metronidazol, nie został do końca poznany. Początkowo badano udział dwóch genów: *rdxA*, kodującego niezależną od tlenu nitroreduktazę NADPH, oraz *frxA*, kodującego flawinową oksydoreduktazę NAD(P)H, których inaktywacja (jednoczesna – zarówno genu *rdxA* oraz *frxA*, lub każdego z osobna) prowadziła do rozwinięcia oporności *H. pylori* na metronidazol [41]. Następne badania sugerowały jednak, że oporność *H. pylori* na ten chemioterapeutyk mogła powstawać bez mutacji w genach *rdxA* oraz *frxA*, lub tylko w wyniku mutacji w genie *frxA* [49]. Wnioski płynące z kolejnych badań wskazywały na zaangażowanie także innych genów, których rola w rozwoju oporności *H. pylori* na metronidazol nie została do tej pory wyjaśniona [21, 26].

Pomimo rzadko występującej oporności na tetracyklinę, opisano mechanizm oporności szczepów *H. pylori* na ten antybiotyk. Jest on związany z mutacją, w wyniku której następuje zamiana 3 nukleotydów – AGA na TTC w pozycji 965–967 genu kodującego podjednostkę 16S rRNA, będącą miejscem wiązania tetracykliny [68]. Tylko ta potrójna mutacja doprowadza do stabilnej oraz znaczącej oporności na tetracyklinę. Mutacje w jednym lub dwóch nukleotydach nie mają znaczenia klinicznego [16]. Być może z tego względu, oporność na tetracyklinę wśród szczepów *H. pylori* występuje rzadko, podobnie jak oporność na amoksycylinę [53].

Mechanizm oporności *H. pylori* na amoksycylinę nie jest do końca poznany. Początkowo izolowano szczepy *H. pylori* o niestabilnej oporności na amoksycylinę, która zanikała po zamrożeniu szczepów w -80°C . Natomiast pierwszy szczep *H. pylori* o stabilnej oporności na amoksycylinę (tzw. szczep Hardenberg) został wyizolowany od 82-letniego pacjenta w Holandii [71]. Gerrits i wsp. analizując szczep Hardenberg wykazali, że przyczyną jego stabilnej

oporności na amoksycylinę mogła być mutacja w genie *pbp-1A* (penicillin-binding protein 1A gene), prowadząca do zmiany składu aminokwasowego w białku PBP-1A, co wpływa na stopień powinowactwa tego białka do amoksycyliny [25]. Chociaż nie można wykluczyć roli innych genów w rozwoju oporności *H. pylori* na amoksycylinę, to obecne badania wskazują, że występowanie kilku różnych mutacji w genie *pbp-1A* lub jednocześnie w kilku genach (*pbp1*, *hopB* oraz *hopC*), jest głównym czynnikiem odpowiadającym za rozwój stabilnej oporności na tą półsyntetyczną penicylinę. Niestabilna oporność na amoksycylinę jest warunkowana brakiem ekspresji białka wiążącego penicylinę – PBP-D (PBP-4) [14, 24].

W przeciwieństwie do klarytromycyny, zastosowanie szybkich testów genetycznych, wykrywających oporność *H. pylori* na amoksycylinę, jest obecnie wykluczone ze względu na różnorodność mutacji w genie *pbp-1A*, warunkujących oporność na tą penicylinę [24].

4. Występowanie oporności *H. pylori* na leki przeciwbakteryjne

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na skuteczność terapii zakażenia *H. pylori*, jest wrażliwość tej bakterii na stosowane w leczeniu antybiotyki oraz chemioterapeutyki. Znajomość częstości występowania pierwotnej oporności szczepów *H. pylori* w danym kraju na leki przeciwbakteryjne, decyduje o ich zastosowaniu w terapii eradykacyjnej [18].

Występowanie oporności na dany lek zależy od regionu geograficznego, płci, wieku oraz przynależności do danej grupy etnicznej [11, 64].

Mówiąc o oporności należy pamiętać, że istnieją 2 typy oporności. Pierwotna, występująca przed rozpoczęciem terapii eradykacyjnej oraz wtórna, nabywana w trakcie trwania kuracji antybiotykowej przez szczepy uprzednio wrażliwe. Dodatkowo można wyróżnić jeszcze jeden rodzaj oporności (tzw. post-treatment resistance), który wykrywany jest po nieskutecznej terapii eradykacyjnej, kiedy nie była znana lekowrażliwość szczepu *H. pylori* przed wprowadzeniem leczenia [7].

Ze względu na nieścisłości pojawiające się w literaturze w związku z istnieniem oporności wtórnej i po leczeniu, w pracy tej dokonano przeglądu występowania pierwotnej oporności *H. pylori* na leki przeciwbakteryjne, stosowane powszechnie w leczeniu zakażenia tą bakterią. Poniższe dane dotyczą populacji osób dorosłych.

4.1. Oporność *H. pylori* na metronidazol

Jak opisano w Europie, pod koniec lat 90-tych, częstość występowania pierwotnej oporności *H. pylori*

na metronidazol wahała się od 20% do 40% [53]. Wieloośrodkowe badania, przeprowadzone w 17 krajach, wykazały ją u około 33% izolowanych szczepów *H. pylori*, nie stwierdzając istotnych różnic pomiędzy północną i południową częścią Europy (odpowiednio 33% i 40,8%). Natomiast istotnie niższy poziom oporności zanotowano w Środkowej oraz Wschodniej Europie (29,2%) [27].

W USA, w tym okresie, oporność na metronidazol wynosiła od 21,6% do 33,9%. Znacznie wyższy odsetek szczepów opornych zanotowano w krajach rozwijających się, takich jak Meksyk (76,3%), Brazylia (53%), czy Korea (61%). Prawdopodobnie wynikało to z częstego stosowania niedrogich nitroimidazoli w leczeniu infekcji pasożytniczych. Stosunkowo niski odsetek izolatów opornych stwierdzono w Japonii (9–12,4%) [42, 53, 67].

Badania przeprowadzone w Europie Wschodniej, w okresie od 1998 do 2000 roku, wykazały wzrost oporności na metronidazol wśród szczepów *H. pylori*, która wyniosła średnio 39% (Bułgaria – 33,3%, Polska – 42,9%, Grecja – 47%) [7]. Zbliżony odsetek szczepów opornych stwierdzono w Finlandii (38%), natomiast niższy zanotowano w Danii (21%) oraz w Holandii (14,4%) [40, 43, 60].

Ogólnopolskie, wieloośrodkowe badania wykonane w latach 2000–2003, wykazały pierwotną oporność *H. pylori* na metronidazol w zakresie od 27% do 52% [46]. W badaniach przeprowadzonych w okresie od 2001 do 2004 roku, w 6 ośrodkach – Warszawa, Płock, Rzeszów, Sanok, Katowice, wynosiła średnio 42% przy braku istotnych różnic pomiędzy ośrodkami. Dodatkowo zauważono, jej częstsze występowanie u kobiet niż u mężczyzn (odpowiednio 58,5% i 37%), prawdopodobnie ze względu na powszechne użycie leku w terapii zakażeń ginekologicznych, co zgodne jest z doniesieniami innych autorów [21, 43].

Wysoki odsetek szczepów opornych (66,2%) zarejestrowano w 2003 roku w Korei, co w porównaniu do roku 1987 (53%), świadczyło o jego wzroście [42].

Odmianą sytuację zaobserwowano w Bułgarii, gdzie oporność szczepów *H. pylori* na metronidazol, w okresie od 2003 do 2004 roku wynosiła 23%, co oznaczało jej spadek w porównaniu do lat poprzednich [7, 8].

Znaczny odsetek szczepów opornych (56,1%) wykazano w ostatnich badaniach (2003–2006) przeprowadzonych w północnej Chorwacji [51].

Lekowrażliwość *H. pylori* można oznaczyć metodami ilościowymi, określając MIC (minimal inhibitory concentration), przy użyciu pasków bibułowanych nasączonych antybiotykiem/chemioterapeutykiem w gradiencie stężeń (E-testów) lub metodą seryjnych rozcieńczeń antybiotyku/chemioterapeutyku w podłożu. Istnieją doniesienia, mówiące o dużej rozbieżności

w wynikach pomiarów wrażliwości *H. pylori* na metronidazol, pomiędzy tymi dwoma metodami [53]. M e g r a u d i wsp. stwierdzili większą ilość szczepów opornych na metronidazol stosując oznaczenie Etestem, w porównaniu do metody seryjnych rozcieńczeń [52]. Natomiast badania przeprowadzone przez R o z y n e k i wsp. wykazały znacznie mniejsze różnice w wynikach przy zastosowaniu obydwu metod [64]. Podobnie, badania G e r r i t s i wsp. nie wykazały istotnych różnic w wartościach MIC oznaczonych w obydwu metodach. Natomiast potwierdziły, że szczepy *H. pylori*, hodowane w warunkach mikroaerofilnych, są *in vitro* odporne na metronidazol, a stają się całkowicie wrażliwe na lek, jeżeli hodowla prowadzona jest w warunkach beztlenowych. Zjawisko to, może mieć istotne znaczenie w eradykacji bakterii w środowisku żołądka [26].

Ze względu na to, że oporność *H. pylori* na metronidazol w warunkach *in vitro* nie musi odpowiadać oporności *in vivo*, Raport Uzgodnieniowy Maastricht-3 2005 nie zaleca rutynowego oznaczania wrażliwości *H. pylori* na metronidazol. Ponadto, metody oznaczania wrażliwości *H. pylori* na ten chemioterapeutyk wymagają dalszej standaryzacji [63].

Jak wynika z powyższych danych, w wielu krajach notuje się wysoki odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol (Meksyk – 76,3%, Brazylia – 53%, Korea – 61%, Polska – 42,9%, Grecja – 47%, Finlandia – 38%), co jest skutkiem nagminnego stosowania tanih nitroimidazoli w leczeniu infekcji pasożytniczych, stomatologicznych oraz ginekologicznych. Jedynie w Holandii odsetek szczepów opornych na metronidazol jest niski, co prawdopodobnie związane jest z najniższą konsumpcją antybiotyków i chemioterapeutyków w tym kraju w porównaniu do innych państw europejskich (Francja, Grecja, Włochy, Hiszpania).

Jednak oporność *H. pylori* na metronidazol w warunkach *in vitro* niekoniecznie oznacza niepowodzenie terapii eradykacyjnej, gdyż szczepy odporne *in vitro* mogą być wrażliwe na dany lek *in vivo*.

Testy do oznaczania wrażliwości *H. pylori* na metronidazol wymagają dalszej standaryzacji.

4.2. Oporność *H. pylori* na klarytromycynę

Od połowy lat 90-tych, kiedy klarytromycyna została wprowadzona do terapii, obserwuje się narastanie oporności wśród szczepów *H. pylori* na ten lek [5]. Częste stosowanie klarytromycyny w leczeniu zakażeń stomatologicznych oraz infekcji układu oddechowego przyczyniło się do znacznego wzrostu ilości opornych szczepów *H. pylori* [19, 21, 43, 53, 64].

W Polsce, od lat 1992–1995, kiedy wprowadzono do leczenia antybiotyki z grupy makrolidów,

konsumpcja klarytromycyny w okresie od 1996 do 2000 roku wzrosła ponad 3-krotnie [7]. W Japonii, pomiędzy 1993 a 2000 rokiem, spożycie klarytromycyny zwiększyło się 4-krotnie, co doprowadziło do 4-krotnego wzrostu oporności na ten antybiotyk. W Holandii, jednak pomimo 3-krotnego zwiększenia zużycia klarytromycyny pomiędzy 1993 a 1997 rokiem, nie zauważono znaczącego wzrostu oporności na makrolidy. Prawdopodobnie wynikało to z ich racjonalnego stosowania [53].

Pod koniec lat 90-tych, w Europie, pierwotna oporność *H. pylori* na klarytromycynę wynosiła średnio 9,9%. Wykazano, że w Północnej Europie była niska (4,2%), wyższa w Środkowej i Wschodniej Europie (9,3%) oraz najwyższa w części południowej (18,4%) [27]. Powyższe wyniki odzwierciedlają niskie spożycie makrolidów w Północnej i Środkowej Europie [43].

Wysoki odsetek oporności *H. pylori* na klarytromycynę notowano w Meksyku (25%), niższy w USA (10–12%) oraz w Japonii (11–13%), a najniższy w Korei i Hong-Kongu (około 5%) [53].

W Europie Wschodniej, w okresie od 1998 do 2000 roku, średnio 10,2% szczepów opornych było na klarytromycynę (Bułgaria 10,9%, Polska 4,8%, Grecja 10,6%) [7]. Zbliżony odsetek szczepów opornych zanotowano w Danii (11%). Natomiast w Holandii oraz Finlandii oporność na klarytromycynę była znikoma (1–2%) [40, 43, 60].

Ogólnopolskie badania, prowadzone w latach 2000–2003 oraz 2001–2004, wykazały pierwotną oporność *H. pylori* na ten antybiotyk, odpowiednio na poziomie 3–27% oraz 15% [21, 46]. Wyniki uzyskane przez ośrodki, biorące udział w badaniach, znacznie różniły się w zależności od regionu.

W Korei oporność szczepów na klarytromycynę wynosiła 13,8% (2003) i była znacznie wyższa w porównaniu do 1994 roku, kiedy sięgała zaledwie 2,8% [42].

Jak wynika z badań przeprowadzonych w Bułgarii (2003–2004), brak wrażliwości *H. pylori* na klarytromycynę stwierdzono u 14,3% szczepów z tendencją wzrostową w porównaniu do lat poprzednich [8].

Ostatnie badania przeprowadzone w północnej Chorwacji (2003–2006) dowiodły o pierwotnej oporności na klarytromycynę sięgającej aż 48,8%, podczas gdy w 2001 roku odsetek ten wynosił zaledwie 8% [51, 53].

Jeżeli pierwotna oporność *H. pylori* na klarytromycynę w danej populacji jest wyższa niż 15–20% Konsensus Maastricht-3 2005 zaleca wykluczenie stosowania tego antybiotyku lub wykonanie antybiogramu przed wprowadzeniem leczenia eradykacyjnego. Zatem w Polsce, zgodnie z powyższymi danymi, nie powinno się stosować klarytromycyny w terapii zakażenia *H. pylori* bez wstępnej oceny lekowrażliwości [63].

Jak wynika z powyższych danych, w wielu krajach obserwuje się narastanie pierwotnej oporności

H. pylori na klarytromycynę. Prawdopodobnie wynika to z nadmiernego stosowania makrolidów w leczeniu wielu infekcji (głównie układu oddechowego). Zjawisko to budzi duże obawy związane ze skutecznością terapii eradykacyjnej zakażeń *H. pylori*. Do tej pory klarytromycyna stanowiła jeden z podstawowych antybiotyków stosowanych w leczeniu tych zakażeń. Obecnie, ze względu na wysoki odsetek szczepów opornych i związane z tym niepowodzenia w terapii eradykacyjnej, zaleca się ciągle monitorowanie oporności na klarytromycynę oraz oznaczanie wrażliwości na ten lek, przed wprowadzeniem go do terapii.

Ciekawych informacji, dotyczących zależności pomiędzy rodzajem choroby a częstością występowania oporności *H. pylori* na klarytromycynę, dostarczyli naukowcy z Francji i Niemiec. Wykazali, że odsetek szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę był znacznie wyższy u pacjentów z dyspepsją niewrzodową – NUD (non ulcer dyspepsia), niż u pacjentów z chorobą wrzodową (16,7% v 5,6%). Może być to związane z tym, że prawie wszyscy chorzy z chorobą wrzodową, w przeciwieństwie do pacjentów z NUD, zakażeni są szczepami posiadającymi gen *cagA* (cytotoxin-associated geneA) [53].

Gen *cagA*, kodujący immunogenne białko CagA, wchodzi w skład tzw. wyspy patogenności *cagPAI* (cytotoxin-associated gene A Pathogenicity Island), która stanowi fragment DNA o długości około 40 kbp, zawierający geny odpowiedzialne za wysoką wirulencję szczepów *H. pylori* [29].

Szczepy *H. pylori cagA+* mogą łatwiej ulec eradykacji, przypuszczalnie ze względu na krótszy czas ich generacji w porównaniu do szczepów pozbawionych genu *cagA*. Ze względu na to, że antybiotyki działają na komórki dzielące się, wykazują większą aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do szybko rosnących szczepów *H. pylori cagA+* niż do szczepów *cagA-*, będących w tym czasie w fazie zastoju. Ponadto, niektóre białka kodowane przez *cagPAI* indukują sekrecję prozapalnej cytokiny – interleukiny 8 (IL-8). Zapalenie błony śluzowej żołądka powoduje wzrost przepływu krwi w żołądku, a to z kolei zapewnia lepszą dyfuzję antybiotyków. Bezpośredni kontakt bakterii *H. pylori cagA+* z komórkami nabłonka żołądka (w wyniku połączenia bakteryjnych białek CagL z integralnymi – α 5, β 1 błony komórkowej komórek nabłonka żołądka) może zwiększać dostępność bakterii dla antybiotyków [9, 33, 45, 70]. Inne przypuszczenia związane są z większą konsumpcją antybiotyków przez pacjentów z NUD [53].

Odmienne wyniki uzyskano w Turcji, gdzie oporność na klarytromycynę była wyższa u pacjentów z wrzodem dwunastnicy w porównaniu do pacjentów z NUD (40,9% v. 23,1%) [4].

4.3. Szczepy *H. pylori* o podwójnej oporności

Ze względu na częste stosowanie metronidazolu i klarytromycyny w terapii zakażenia *H. pylori* coraz częściej stwierdza się obecność szczepów opornych jednocześnie na obydwa te leki [53].

Pod koniec lat 90-tych, podwójna oporność szczepów *H. pylori* na metronidazol oraz klarytromycynę w Europie była niska i wahała się w zakresie od 0,8% do 9,1% [7, 27, 53]. W Azji odsetek szczepów opornych sięgał jedynie 2–3%. Natomiast znacznie więcej szczepów o podwójnej oporności stwierdzono w krajach rozwijających się, takich jak Meksyk (18%) [53].

W Polsce, według badań prowadzonych w latach 2000–2003 oraz 2001–2004 odsetek szczepów *H. pylori* wykazujących podwójną pierwotną oporność na metronidazol oraz klarytromycynę występował w zakresie od 3% do 11% [21, 46].

4.4. Oporność *H. pylori* na amoksycylinę

Z badań przeprowadzonych w Polsce w latach 2000–2004 wynika, że wszystkie szczepy *H. pylori* były wrażliwe na amoksycylinę, co nie zmienia się od lat, pomimo częstego stosowania amoksycyliny zarówno w eradykacji zakażenia *H. pylori* jak i w leczeniu innych infekcji [21, 46].

Pierwotna oporność *H. pylori* na amoksycylinę jest bardzo niska na całym świecie, a w większości krajów w ogóle nie została odnotowana. Wykazano 0,2% szczepów opornych we Włoszech, 0,3% w Hong-Kongu i w Japonii, 0,9% w Izraelu oraz 1,3% w Bułgarii [8, 53, 60]. Jednak badania przeprowadzone w Korei (2003) potwierdziły istnienie wysokiej oporności *H. pylori* na amoksycylinę, sięgającej 18,5% [42].

Obecnie, amoksycylina stanowi antybiotyk o dużej skuteczności, wchodzący w skład terapii pierwszego rzutu. Jeżeli w przyszłości oporność *H. pylori* na amoksycylinę będzie wzrastać, może doprowadzić to do znacznego spadku efektywności leczenia zakażeń *H. pylori*.

4.5. Oporność *H. pylori* na tetracyklinę

Ograniczone zastosowanie tetracyklin w ostatnich latach w krajach rozwiniętych, wynikające z wprowadzenia do terapii nowszych makrolidów i fluorochinolonów, występowanie powszechnej oporności na tetracyklinę wśród innych patogenów oraz potrójna mutacja, niezbędna do rozwinięcia oporności *H. pylori* na ten lek sprawiają, że zjawisko oporności wśród pałeczek *H. pylori* na tetracyklinę występuje dosyć rzadko [64].

Zanotowano brak szczepów *H. pylori* opornych na tetracyklinę w Stanach Zjednoczonych, Portugalii,

Holandii, Szwecji, Niemczech, Polsce oraz Austrii [16, 21]. W Wielkiej Brytanii odsetek szczepów opornych sięgał 0,5%, w Hiszpanii 0,7% [53]. Nieco wyższy procent odnotowano w Bułgarii (7,4%) [8]. Natomiast 12,3% szczepów opornych stwierdzono w Korei (badania z 2003 roku) [42].

Tetracyklina jest przede wszystkim stosowana w terapii drugiego rzutu, ale w krajach rozwijających się może także wchodzić w skład terapii pierwszego wyboru, ze względu na powszechne występowanie szczepów opornych na metronidazol oraz wysoki koszt stosowania klarytromycyny [16].

Pomimo, iż wielolekooporność szczepów *H. pylori* jest niemal niespotykana w Europie, ostatnie badania przeprowadzone w Wielkiej Brytanii wskazały na pojawienie się szczepów wykazujących jednoczesną oporność na kilka leków, co budzi duże obawy na przyszłość, związane ze skuteczną eradykacją zakażenia *H. pylori* [12].

5. Nowe koncepcje leczenia zakażenia *H. pylori*

Narastająca lekooporność szczepów *H. pylori*, będąca jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w eradykacji tego zakażenia, skłania do opracowywania alternatywnych schematów leczenia skojarzonego. Ostatnio, duże nadzieje budzi wprowadzenie do terapii eradykacyjnej zakażenia *H. pylori* fluorochinolonów. Poza udowodnioną aktywnością *in vitro*, potwierdzono także ich działanie synergistyczne z inhibitorami pompy protonowej [13].

Lewofloksacyna (S-enancjomer ofloksacyny) charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego lewofloksacyny polega na blokowaniu replikacji DNA bakterii przez zahamowanie aktywności topoiizomerazy II i IV [20]. Lek ten oznacza się wysoką biodostępnością oraz dobrą dystrybucją w płynach oraz tkankach.

Badania przeprowadzone przez Nista i wsp. (Włochy) dowodzą wyższej skuteczności 7-dniowej kuracji potrójnej zawierającej lewofloksacynę (87%), w porównaniu do standardowej terapii pierwszego rzutu (72–75%) [56]. Podobne wyniki uzyskał także Antos i wsp. (Niemcy) [3]. Powyższe badania sugerują poprawę efektywności leczenia, poprzez wprowadzenie lewofloksacyny do terapii pierwszego rzutu. Odmiennie wyniki uzyskano w Belgii, gdzie zaleca się określanie wrażliwości na fluorochinolony przed wprowadzeniem ich do terapii eradykacyjnej, ze względu na wysoki poziom oporności szczepów *H. pylori* na tą grupę leków (16,8%) [6]. Biorąc pod uwagę łatwe nabywanie oporności bakterii na fluorochinolony (mutacje punktowe), zasadne wydaje się

być zastosowanie lewofloksacyny tylko do leczenia ciężkich przypadków [13].

Innym alternatywnym lekiem proponowanym w terapii trzeciego rzutu w krajach rozwijających się jest **furazolidon**. Ta pochodna nitrofuranu wykazuje działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwprzetrzaniakowe. Mechanizm działania furazolidonu jest skomplikowany. Prawdopodobnie lek ulega redukcji w komórce bakterii do cytotoksycznych metabolitów, hamuje syntezę enzymów, procesy oddychania komórkowego bakterii oraz zaburza przemianę kwasu pirogronowego, prowadząc do uszkodzenia DNA [62, 36]. Działa bójczo w stosunku do *H. pylori* i praktycznie nie prowadzi do rozwoju oporności. Ze względu na niski koszt oraz skuteczność działania w przypadku wysokiej oporności szczepów na metronidazol stosowany jest chętnie w krajach ubogich w schemacie czteroskładnikowym (PPI + sole bizmutu + tetracyklina + furazolidon) u pacjentów po nieskutecznej terapii eradykacyjnej. Lek może wywoływać pewne efekty uboczne (nudności, wymioty, bóle brzucha, gorączka, wysypka, świąd), a przy długotrwałym stosowaniu może powodować wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz zaburzenia psychiczne (z powodu hamowania aktywności monoaminooksydazy). Jednak wyniki badań, dotyczące częstości występowania objawów ubocznych oraz ich wpływu na przyjmowanie leków przez pacjenta, nie są zgodne [22, 28, 54].

Rifabutyna to pochodna rifamycyny, zarezerwowana głównie do leczenia wielolekoopornych prątków gruźlicy [28]. Ze względu na wysoką wrażliwość szczepów *H. pylori* na ten lek, brak szczepów opornych oraz stabilność w szerokim zakresie pH, rifabutynę zastosowano u chorych, którzy przeszli kilka nieudanych terapii zakażenia *H. pylori*. Niemniej wyniki dotyczące skuteczności tego leku w terapii eradykacyjnej są sprzeczne [13]. Obecnie stosowanie rifabutyny w eradykacji *H. pylori* stoi pod znakiem zapytania.

W trakcie leczenia eradykacyjnego dosyć często występują objawy niepożądane (15–30%) [18]. Stosowana terapia antybiotykowa w połączeniu z lekami hamującymi wydzielanie kwasu solnego, w dużym stopniu zaburza funkcjonowanie naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego człowieka. Obecnie wzrasta zainteresowanie rolą probiotyków w leczeniu zakażenia *H. pylori*. Probiotyki są kulturami żywych mikroorganizmów (głównie bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*), wywierające korzystny wpływ na organizm człowieka, poprzez zapewnienie właściwej równowagi mikroflory zasiedlającej przewód pokarmowy. Wykazano, że pałeczki *Lactobacillus* odgrywają istotną rolę w eradykacji *H. pylori*. Poprzez wytwarzanie nadtlenu wodoru, kwasu mlekowego oraz octowego, hamują wzrost oraz kolonizację błony śluzowej żołądka przez *H. pylori*, obniżają również

poziom IL-8 w żołądku, co może prowadzić do zmniejszenia lub zahamowania procesu zapalnego [1, 55, 61].

Prawdopodobny mechanizm hamowania wytwarzania IL-8 przez pałeczki *Lactobacillus* polega na zaburzeniu działania wielobiałkowego kompleksu w komórkach *H. pylori* – tzw. aparatu sekrecyjnego typu IV, kodowanego przez geny zlokalizowane w obrębie *cagPAI*, który jest odpowiedzialny za transport immunogenego białka CagA do wnętrza komórek nabłonka żołądka oraz za indukcję produkcji IL-8 [29, 66].

Z badań przeprowadzonych u ludzi wynika, że bakterie probiotyczne, podawane w trakcie trwania leczenia eradykacyjnego, znacznie zwiększają skuteczność leczenia zakażenia *H. pylori* oraz zmniejszają działania niepożądane stosowanych w leczeniu antybiotyków [65, 72].

Ze względu na powszechne występowanie oraz konsekwencje zakażeń *H. pylori*, od kilkunastu lat trwają intensywne badania nad szczepionką przeciwko *H. pylori* zarówno profilaktyczną (dla osób nie zakażonych) jak i terapeutyczną (dla osób zakażonych) [38]. Punktem wyjściowym do konstruowania szczepionek anty-*Helicobacter* było opublikowanie w 1997 oraz 1999 roku pełnej sekwencji genomu dwóch szczepów *H. pylori*- 26 695 oraz J99 [29]. Jak dotąd, pomimo intensywnych badań i wielu eksperymentów przeprowadzonych na modelach zwierzęcych oraz na ludziach, nie udało się wyprodukować skutecznej szczepionki przeciwko *H. pylori*.

Obecnie, analiza transkryptomu oraz proteomu *H. pylori* i komórek eukariotycznych budzi duże nadzieje na lepsze zrozumienie interakcji zachodzących pomiędzy *H. pylori* a komórkami nabłonkowymi oraz immunologicznymi gospodarza. Wpłynie to z pewnością na postęp w profilaktyce i zwalczaniu zakażeń *H. pylori* [39].

Do tej pory opublikowano wiele prac dotyczących badań prowadzących do powstania skutecznej szczepionki w zwalczaniu lub zapobieganiu zakażenia *H. pylori* [38]. Temat ten jednak ze względu na problematykę jak i jej zakres wykracza poza ramy niniejszej publikacji.

6. Podsumowanie

Narastająca w ostatnich latach oporność szczepów *H. pylori* na klarytromycynę oraz utrzymująca się na wysokim poziomie oporność na metronidazol, stanowi poważny problem terapeutyczny, który wymaga ciągłego monitorowania, w celu ograniczenia powstawania i rozprzestrzeniania się szczepów opornych. O ile oporność na metronidazol nie wpływa tak znacząco na spadek skuteczności terapii eradykacyjnej, to oporność na klarytromycynę w dużym stopniu zmniejsza

sza szansę na wyleczenie zakażenia *H. pylori*. Z tego względu zasadne jest wykonywanie oznaczenia wrażliwości wyizolowanych szczepów na ten antybiotyk przed włączeniem go do leczenia eradykacyjnego, a nie jak zaleca PTG, po nieskutecznej terapii drugiego rzutu [18, 63]. W związku z tym, największe nadzieje na przyszłość są w szybkich metodach wykrywania oporności na leki, takich jak real-time PCR. Stosując metody genetyczne, wynik uzyskuje się już po kilku godzinach od momentu pobrania próbki.

Występowanie zjawiska narastania oporności na powszechnie stosowane preparaty przeciwbakteryjne w leczeniu zakażenia *H. pylori* w Polsce oraz na świecie uzasadnia poszukiwanie i opracowywanie nowych, skuteczniejszych schematów leczenia.

Wyniki dotychczasowych badań nad rolą probiotyków w leczeniu zakażenia *H. pylori* skłaniają do dyskusji nad celowością włączenia ich do terapii eradykacyjnej.

Skonstruowanie skutecznej oraz bezpiecznej szczepionki przeciwko zakażeniom *H. pylori* jest kwestią bliżej nieokreślonej przyszłości.

Piśmiennictwo

- Aiba Y., Suzuki N., Kabir A.M., Takagi A., Koga Y.: Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.* **93**, 2097–2101 (1998)
- Ando T., Goto Y., Maeda O., Watanabe O., Ishiguro K., Goto H.: Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **12**, 181–186 (2006)
- Antos D., E. Bayerdörffer i wsp.: 7-day triple therapy of *Helicobacter pylori* infection with levofloxacin, amoxicillin, and high-dose esomeprazole in patients with known antimicrobial sensitivity. *Helicobacter*, **11**, 39–45 (2006)
- Baglan P.H., Bozdayi G., Ozkan M., Ahmed K., Bozdayi A.M., Ozden A.: Clarithromycin resistance prevalence and *Icea* gene status in *Helicobacter pylori* clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. *J. Microbiol.* **44**, 409–416 (2006)
- Bąk-Romaniszyn L., Płaneta-Malecka I.: Przyczyny niepowodzenia eradykacji *Helicobacter pylori*. *Ped. Wsp. Gastroent. Hep. Żyw. Dziecka*, **6**, 387–391 (2004)
- Bogaerts P., Berhin C., Nizet H., Glupczynski Y.: Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter*, **11**, 441–445 (2006)
- Boyanova L., M. Popova i wsp.: The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in eastern Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**, 388–396 (2002)
- Boyanova L., Z. Krastev i wsp.: Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Bulgarian children and adult patients over 9 years. *J. Med. Microbiol.* **55**, 65–68 (2006)
- Broutet N., Marais A., Lamouliatte H., Mascarel A., Samoyeau R., Salamon R., Megraud F.: *cagA* status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1319–1322 (2001)
- Brown L.M.: *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev.* **22**, 283–297 (2000)
- Bytzer P., O' Morain C.: Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **10**, 40–46 (2005)
- Chisholm S.A., Owen R.J.: Characterization of multi-resistant *Helicobacter pylori* emerging in the UK. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Munich/Germany, 31 March–3 April 2007
- Cianci R., Montalto M., Pandolf F., Gasbarrini G.B., Cammarota G.: Third-line rescue therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.* **12**, 2313–2319 (2006)
- Co E.M., Schiller N.L.: Resistance mechanisms in an *in vitro*-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 4174–4176 (2006)
- Czerwonka-Szafarska M., Zielińska H., Parzęcka M.: Zakażenie *Helicobacter pylori*- co wiemy i co wiedzieć powinniśmy. *Klin. Ped.* **12**, 5020–5023 (2004)
- Dailidienė D., Bertoli M.T., Miciulevičienė J., Mukhopadhyay A.K., Dailidė G., Pascasio M.A., Kupcinskas L., Berg D.E.: Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Ant. Agents Chem.* **46**, 3940–3946 (2002)
- Dziesięzowski J., Jarosz M.: Wytyczne postępowania leczniczego w infekcji *Helicobacter pylori*. *Med. po Dypl.* **13**, 39–43 (2006)
- Dziesięzowski J., M. Jarosz i Grupa Robocza PTG*: Postępowanie w zakażeniu *Helicobacter pylori* (rok 2004). Wytyczne opracowane przez Grupę Roboczą Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii. *Gastroenterol. Pol.* **11**, 41–48 (2004)
- Dzierżanowska-Fangrat K., Rozynek E., Jozwiak P., Celinska-Cedro D., Madalinski K., Dzierżanowska D.: Primary resistance to clarithromycin in clinical strains of *Helicobacter pylori* isolated from children in Poland. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **18**, 387–390 (2001)
- Dzierżanowska D.: Antybiotyki w praktyce ambulatoryjnej. Alfa-medica Press, Bielsko-Biała, 2005
- Dzierżanowska-Fangrat K., D. Dzierżanowska i wsp.: Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a multicentre study. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26**, 230–234 (2005)
- Eisig J.N., Silva F.M., Rodriguez T.N., Hashimoto C.L., Barbuti R.C.: A furazolidone-based quadruple therapy for *Helicobacter pylori* retreatment in patients with peptic ulcer disease. *Clinics*, **60**, 485–488 (2005)
- European *Helicobacter Pylori* Study Group: Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Gut*, **41**, 8–13 (1997)
- Gerrits M.M., Godoy A.P., Kuipers E.J., Ribeiro M.L., Stoof J., Mendonca S., van Vliet A.H., Pedrazzoli J.Jr, Kusters J.G.: Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **11**, 181–187 (2006)
- Gerrits M.M., Schuijffel D., van Zwet A.A., Kuipers E.J., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Kusters J.G.: Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2229–2233 (2002)
- Gerrits M.M., van der Wouden E.J., Bax D.A., van Zwet A.A., van Vliet A.H.M., de Jong A., Kusters J.G., Thijs J.C., Kuipers E.J.: Role of the *rdxA* and *frxA* genes in oxygen-dependent metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **53**, 1123–1128 (2004)

27. Glupczynski Y., Megraud F., Lopez-Brea M., Andersen L.P.: European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 820–823 (2001)
28. Go M.F.: Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori*. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* **8**, 163–174 (2005)
29. Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Analiza czynników wirulencji *Helicobacter pylori* w świetle genomiki. *Post. Mikrobiol.* **42**, 115–137 (2003)
30. Goldman K.J., Cockburn M.: The role of epidemiology in understanding the health effects of *Helicobacter pylori*. *Epidemiology*, **12**, 266–271 (2001)
31. Gościński G.: Przeciwciała w zakażeniach *Helicobacter pylori*. Rozprawa na stopień doktora habilitowanego. Akademia Medyczna, Wrocław, 2000
32. Gzyl A., Augustynowicz E., Dzierżanowska D., Rożynek E., Dura W., Celińska-Cedro D., Berg D.E.: Genotypes of *Helicobacter pylori* in Polish population. *Acta Microbiol. Pol.* **48**, 261–275 (1999)
33. Hauck C.R.: Preparing the shot. *Nature*, **449**, 798–799 (2007)
34. Heatley R.V.: *Helicobacter pylori*. Alfa-medica press, Bielsko-Biała, 1999
35. Howden C.W., Hunt R.H.: Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. Ad Hoc Committee on Practice Parameters of the American College of Gastroenterology. *Am. J. Gastroenterol.* **93**, 2330–2338 (1998)
36. Hryniewicz W., Meszaros J. (red.): Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001
37. Iwańczak F., E. Vogt i wsp.: Badania epidemiologiczne częstości występowania zakażenia *Helicobacter pylori* u dzieci w Polsce. *Ped. Wsp. Gastroent. Hep. Żyw. Dziecka*, **6**, 345–350 (2004)
38. Jagusztyn-Krynicka E.K., Godlewska R., Łaniewski P.: *Helicobacter pylori* – patogen roku 2005. *Kosmos, Probl. Nauk Biol.* **54**, 307–319 (2005)
39. Jagusztyn-Krynicka E.K.: The current status of *Helicobacter* vaccines-influence of genomics and proteomics on identification of *Helicobacter* gene products as potential vaccine candidates. 2nd Polish-Ukrainian Weigl Conference “Microbiology in the XXI century” Warsaw, 24–26 September 2007
40. Janssen M.J., Hendrikse L., de Boer S.Y., Bosboom R., de Boer W.A., Laheij R.J., Jansen J.B.: *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in a Dutch region: trends over time. *Neth. J. Med.* **64**, 191–195 (2006)
41. Jeong J.Y., Mukhopadhyay A.K., Akada J.K., Dailidienė D., Hoffman P.S., Berg D. E.: Role of FrxA and RdxA nitroreductases of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to metronidazole. *J. Bacteriol.* **183**, 5155–5162 (2001)
42. Kim J.M., Kim J.S., Jung H.C., Kim N., Kim Y.J., Song S.: Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4843–4847 (2004)
43. Koivisto T.T., Rautelin H.I., Voutilainen M.E., Niemelä S.E., Heikkinen M., Sipponen P.I., Färkkilä M.A.: Primary *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in the Finnish population. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **19**, 1009–1017 (2004)
44. Konturek S.J.: Laureaci Nagrody Nobla z fizjologii i medycyny w roku 2005: Barry J. Marshall i Robin J. Warren. *Med. po Dypl.* **14**, 1–6 (2005)
45. Kwok T., S. Backert i wsp.: *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, **449**, 862–866 (2007)
46. Łaszewicz W.: Wyniki badań nad zakażeniem *Helicobacter pylori*. Trans Humana, Białystok, 2004
47. Malfertheiner P., Megraud F., O’ Morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R., Rokkas T., Vakil N., Kuipers E.J.: Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, **56**, 772–781 (2007)
48. Malfertheiner P., Megraud F., O’ Morain C., Hungin A.P., Jones R., Axon A., Graham D.Y., Tytgat G.; European Helicobacter Pylori Study Group (EHPSG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection- The Maastricht 2–2000 Consensus Report. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 167–180 (2002)
49. Marais A., Bilardi C., Cantet F., Mendz G.L., Megraud F.: Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Res. Microbiol.* **154**, 137–144 (2003)
50. Marshall B.J., Warren J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, **1**, 1311–1314 (1984)
51. Marušić Z., Plečko V., Katicić M., [Zcaron]ele-Starčević L., Budimir A., Bedenic B., Presecki Stanko A., Bošnjak Z., Kalenic S.: Primary and secondary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole and azithromycin in the northern part of Croatia. 17th Europ. Congr. of Clin. Microbiol. and Infect. Dis. Munich/Germany, 31 March-3 April 2007
52. Megraud F., Lehn N., Lind T., Bayerdörffer E., O’ Morain C., Spiller R., Unge P., van Zanten S.V., Wrangstadh M., Burman C.F.: Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 Study. *Antimicrob. Agents Chem.* **43**, 2747–2752 (1999)
53. Megraud F.: *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, **53**, 1374–1384 (2004)
54. Megraud F.: Update on therapeutic options for *Helicobacter pylori*-related diseases. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **7**, 115–120 (2005)
55. Michetti P., Dorta G., Brassard D., Vouillamoz D., Schwitzer W., Felley C., Blum A.L., Porta N., Rouvet W., Cortesys-Theulaz J.: *L. acidophilus* supernatant as an adjuvant in the therapy of *H. pylori* in humans. *Gastroenterology*, **108**, A166 (1995)
56. Nista E.C., Candelli M., Zocco M.A., Cremonini F., Ojetti V., Finizio R., Spada C., Cammarota G., Gasbarrini G., Gasbarrini A.: Levofloxacin-based triple therapy in first-line treatment for *Helicobacter pylori* eradication. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 1985–1990 (2006)
57. Oleastro M., Menard A., Santos A., Lamouliatte H., Monteiro L., Barthelemy P., Megraud F.: Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 397–402 (2003)
58. Paradowski L., Błachut K., Annabhani A.: Konsensus Maastricht 2005. Co nowego? *Gastroenterol. Pol.* **13**, 335–336 (2006)
59. Perez-Perez G.I., Rothenbacher D., Brenner H.: Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **9**, 1–6 (2004)
60. Petersen A.M., Gjode P., Vinge O.D., Jensen S., Krogfelt K.A.: *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance and risk factors in Denmark 1998–2004: no need for concern? *Helicobacter*, **11**, 208–211 (2006)
61. Płaneta-Małecka I., Bąk-Romaniszyn L., Plewińska E.M., Czkwianianc E., Seraficka A.: Rola probiotyków w leczeniu zakażenia *Helicobacter pylori* – doniesienie wstępne. *Gastroenterol. Pol.* **11**, 219–222 (2004)

62. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M.: Farmakologia kliniczna. Czelej Sp. z.o.o., Lublin, 2001.
63. Raport Uzgodnieniowy Maastricht III: Aktualne poglądy na wykrywanie i leczenie zakażenia *Helicobacter pylori*. *Med. Prakt.* **7–8**, 157–175 (2007)
64. Rozynek E., Dzierżanowska-Fangrat K., Celińska-Cedro D., Józwiak P., Madaliński K., Dzierżanowska D.: Primary resistance of *Helicobacter pylori* to antimicrobial agents in Polish children. *Acta Microbiol. Pol.* **51**, 255–263 (2002)
65. Sheu B.S., Wu J.J., Lo C.Y., Wu H.W., Chen J.H., Lin Y.S., Lin M.D.: Impact of supplement with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* – containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 1669–1675 (2002)
66. Tamura A., Kumai H., Nakamichi N., Sugiyama T., Deguchi R., Takagi A., Koga Y.: Suppression of *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production *in vitro* and within the gastric mucosa by a live *Lactobacillus* strain. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1399–1406 (2006)
67. Torres J., Camorlinga-Ponce M., Perez-Perez G., Madrazo-De la Garza A., Dehesa M., Gonzalez-Valencia G., Munoz O.: Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2677–2680 (2001)
68. Trieber C.A., Taylor D.E.: Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J. Bacteriol.* **184**, 2131–2140 (2002)
69. Van Doorn L.J., Glupczynski Y., Kusters J.G., Megraud F., Midolo P., Maggi-Solca N., Queiroz D.M., Nouhan N., Stet E., Quint W.G.: Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multi-center validation study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1500–1504 (2001)
70. Van Doorn L.J., Schneeberger P.M., Nouhan N., Plaisier A.P., Quint W.G.V., de Boer W.A.: Importance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut*, **46**, 321–326 (2000)
71. Van Zwet A.A., Vandenbroucke-Grauls C.M., Thijs J.C., van der Wouden E.J., Gerrits M.M., Kusters J.G.: Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet*, **352**, 1595 (1998)
72. Ziemiak W.: Praktyczne aspekty leczenia infekcji żołądkowej *Helicobacter pylori*. *Med. po Dypl.* **13**, 69–74 (2006)
73. Życińska K., Wardyn K.A., Życiński Z.: Zakażenie *Helicobacter pylori* – współczesne poglądy na diagnostykę i leczenie. *Now. Klin.* **9**, 956–959 (2002)

Katarzyna Guz*, Włodzimierz Doroszkiewicz

Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63/77, 50-148 Wrocław, tel. 71-375 62 78, tel./fax 71- 325 21 51

Wpłynęło w maju 2008 r.

1. Wprowadzenie. 2. Historia badań. 3. Przynależność systematyczna *Bartonella* sp. 4. Charakterystyka pałeczek z rodzaju *Bartonella*. 5. Cykl rozwojowy i chorobotwórczość pałeczek *Bartonella* sp. 6. Epidemiologia bartonelloz. 7. Bartonellozy jako choroby wektorowe i odzwierzęce (zoonozy). 8. Bartonellozy u ludzi. 9. Podsumowanie

Biology, ecology and pathogenicity of rods of the *Bartonella* genus

Abstract: The investigation of *Bartonella* rods began in the second half of the XX century. During the last 15 years several new species of bacteria belonging to the genus *Bartonella* have been discovered and all the infections caused by these microorganisms have been rated as „emerging and re-emerging diseases”. At present, over 20 species of the genus *Bartonella* are known. Recently, fourteen of them have been associated with an increasing spectrum of clinical syndromes in humans including bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, bacteremia, endocarditis, myocarditis, neuritidis, chronic lymphadenopathy, and cat scratch disease. Bartonellosis is widespread while the Carrion’s disease appears only in endemic regions of South America. Some of *Bartonella* species can also cause veterinary problems. They are responsible for illnesses of domestic animals. Mammals, particularly rodents, are the natural reservoirs of *Bartonella* spp. They often cause an intraerythrocytic asymptomatic bacteremia in the host. Bartonellosis are vector-borne diseases that are transmitted by blood-sucking arthropods such as: fleas, lice or ticks. A recent research has proved that these bacteria can be transmitted directly as a zoonosis by cats’ or rats’ scratches or bites. *Bartonella* sp. are fastidious, aerobic, pleomorphic gram-negative rods, which grow slowly in the enriched culture medium. Diagnosis of *Bartonella* sp. infections is a rapidly expanding field. Useful methods in the identification of *Bartonella* species comprise the techniques employed in microbiology, histology, genetics and serology. The most universal method to identify *Bartonella* infection is still serology testing. At present, the investigations of *Bartonellaceae* family are carried out in many research centres. It is evident that the growing knowledge about the biology and ecology of these microorganisms is reflected in the constant improvement of the methods of diagnosis, treatment and prevention.

1. Introduction. 2. History of investigation. 3. Taxonomy of *Bartonella* sp. 4. Characteristics of rods of the *Bartonella* genus. 5. Life cycle and pathogenicity of *Bartonella* rods. 6. Epidemiology of bartonellosis. 7. Bartonellosis as a vector-borne and zoonotic diseases. 8. Bartonellosis in humans. 9. Conclusion

Słowa kluczowe: *Bartonella* spp., bartonellozy, biologia i ekologia, metody diagnostyczne

Key words: *Bartonella* spp., bartonellosis, biology and ecology, diagnostic methods

1. Wprowadzenie

Jeszcze do niedawna rodzina *Bartonellaceae* była reprezentowana przez niewielką liczbę bakterii. Początkowo nikt nie brał pod uwagę, że te drobnoustroje mogą wywoływać choroby u ludzi czy też u zwierząt. Prawdopodobnie jedną z podstawowych przyczyn był brak swoistych metod wykrywania i identyfikacji atypowych pałeczek *Bartonella* sp. Obecnie wiadomo, że bakterie te mogą być przyczyną przewlekłych zakażeń u ludzi, przebiegających często bezobjawowo. Schorzenia, którym towarzyszyła niezdiagnozowana gorączka najczęściej występowały w okresie I i II wojny światowej. Przypuszcza się, że większość chorób w okresie wojennym mogło mieć charakter zakażeń bakteryjnych, które nieleczone właściwie prowadziły do poważnych komplikacji zdrowotnych, a nawet śmierci człowieka. Należy także wspomnieć, że obok aspiryny lekiem z wyboru w czasie II wojny była penicylina, która *de facto* nie działa na atypowe patogeny [1, 40].

Gorączki o nieznannej etiologii pojawiały się również w okresie powojennym i dopóki nie nastąpił rozwój technik diagnostycznych pozostawały one niewyjaśnione. Dopiero pod koniec XX wieku dzięki badaniom serologicznym i molekularnym możliwe było odkrycie różnych czynników etiologicznych odpowiedzialnych za cykliczne i przewlekłe gorączki, wśród których znalazły się bakterie z rodzaju *Bartonella*. Pałeczki te są obecnie wykrywane niemalże w każdym materiale biologicznym – prawdopodobnie gdyż posiadają duże zdolności przetrwania w środowisku tj. poza głównym żywicielem. Początkowo uważano je za niepatogenne dla ludzi i zwierząt i traktowano jako bakterie saprofityczne. Z czasem jednak poznano ich ekologię i mechanizmy patogenności, które wskazują jednoznacznie na ich chorobotwórczy charakter. Wszystkie zakażenia wywołane przez te atypowe drobnoustroje uznawane są za zagrażające zdrowiu człowieka i zaliczane do tzw. „emerging and reemerging diseases”. Z dotychczas opisanych 24 gatunków *Bartonella*, ok. 14 związanych jest z zachorowaniami u ludzi, szczególnie u osób z obniżoną odpornością [25, 46]. Stanowią

* Autor korespondencyjny: selene@microb.uni.wroc.pl

one również poważny problem zdrowotny w przypadku zwierząt hodowlanych (gospodarczych) i domowych np.: psów, kotów, królików i bydła. Pałeczki *Bartonella* sp. powszechnie występują w przyrodzie, a gryzonie i inne dzikie zwierzęta, głównie zwierzęta płowa są ich naturalnymi rezerwuarami. Naturalni żywicieli, w których często przebieg bartonelozy jest asymptomatyczny i chroniczny, stanowią także źródło bezpośredniej transmisji bartoneli na podatne organizmy. Najczęściej u ludzi do zakażenia tymi atypowymi patogenami dochodzi w wyniku częstego kontaktu z chorym zwierzęciem, wskutek poślinienia, pogryzienia lub podrapania [7, 27]. Bartonelozy są także uważane za choroby wektorowe, w których szczególną rolę odgrywają stawonogi krwiopijne takie jak pchły, wszy i kleszcze.

2. Historia badań

Pierwszą opisaną infekcją wywołaną przez bakterię z rodzaju *Bartonella* była gorączka okopowa (Trench fever), zwana również gorączką wołyńską lub gorączką pięciodniową. Występowała ona powszechnie u żołnierzy walczących w okopach podczas I i II wojny światowej. Oszacowano, że choroba ta dotknęła ponad milion ludzi, zarówno żołnierzy jak i cywilów [35]. Cechował ją charakterystyczny przebieg w postaci cyklicznego wzrostu temperatury ciała, występującego przeważnie co piąty dzień choroby i towarzyszącą utratą świadomości oraz ostrym bólem kończyn, zwłaszcza goleni [33, 35]. Gorączki o nieznanym etiologii występowały stale przede wszystkim na terenach endemicznych z obniżonym standardem życiowym i opieki medycznej, głównie na obszarze Rosji. Szybko jednak przybrały one charakter epidemiczny szerząc się na niemalże całą zachodnią część kontynentu europejskiego podczas I i II wojny światowej [33, 36]. Pierwsze wzmianki o przewlekłych gorączkach o nieznanym etiologii pochodzą już z okresu średniowiecza [33]. Jednak duże zainteresowanie tą chorobą pojawiło się w okresie masowych zachorowań żołnierzy podczas I wojny światowej [33]. W roku 1916 McNeer i wsp. wykazali, że czynnik odpowiedzialny za gorączkę znajduje się we krwi pacjentów, a wesz ludzka może mieć szczególnie udział w przenoszeniu tego czynnika [36]. Dowodem na to miał być wyraźny spadek zachorowań na bartonelozy i riketsjozy po wprowadzeniu powszechnego programu odwszawiania na terenach epidemicznych. Mimo, że gorączka okopowa zwykle kojarzona była ściśle z wojną, występowała ona również w okresie międzywojennym i po II wojnie światowej [35]. Po pierwszej wojnie światowej zachorowania na gorączkę okopową były powszechnie notowane w Hiszpanii, Szwecji, Ukrainie, Gruzji i Rosji [33]. W 1936 roku Mosing opisał przypadki chorób u pacjentów z identycznymi objawami jak przy gorączce pięciodniowej. Po

1939 roku chorobę o podobnych syndromach zaobserwowano również w Algierii, Egipcie, Addis Abeba w Etiopii (Afryka). W późniejszych latach chorobę tę odnotowywano także w innych regionach świata tj. Azji, głównie w Chinach i Japonii oraz w Ameryce Środkowej (Meksyku) [33]. W tym samym okresie podejmowano liczne próby izolacji i hodowli czynników będących sprawcami gorączek okopowych, ale dopiero w 1961 roku Vinsonowi i Fullerowi po raz pierwszy powiodło się wyodrębnić i namnożyć czynnik tej choroby [35]. Po wprowadzeniu do organizmów ochotników zawiesiny hodowlanej zaobserwowali oni wystąpienie objawów przypominających gorączkę okopową [35]. Zainteresowanie tymi atypowymi mikroorganizmami szczególnie wzrosło w połowie lat 80., kiedy to w 1983 roku Stoler opisał nowy syndrom u ludzi chorych na AIDS [45]. Nowo odkryta jednostka chorobowa z licznymi zmianami skórными, przypominająca mięsaka Kaposiego, przyjęła nazwę naczyńniakowatości bakteryjnej – bacillary angiomatosis (BA). W preparatach histologicznych ze zmian skórnych po zastosowaniu barwienia Warthin-Starry obserwowano liczne drobnoustroje. W kilka lat później, w roku 1990 Relman, po zastosowaniu metod PCR, wykazał udział bakterii *Rochalimaea quintana* w naczyńniakowatości. Nowo odkryty drobnoustroj otrzymał wówczas nazwę BA-TF – czynnika powodującego naczyńniakowatość bakteryjną (bacillary angiomatosis-tissue factor). Później bakterie te wykrywano również w wycinkach tkankowych z wątroby u pacjentów z plamicą wątrobową – peliosis hepatitis (PH), we krwi u ludzi z asymptomatyczną bakteriecią oraz w innych tkankach i narządach tj. skóra, śródbłonek naczyń krwionośnych, śledziona, kości, nerki i płuca [30]. Metody izolacji i hodowli pałeczek *Bartonella* sp. na sztucznych podłożach bakteriologicznych opisał Kohler i wsp. [30]. Po wysiewie materiału pochodzącego z fragmentów skórnych od pacjenta z BA na agarze krwawym wyhodowano bakterie, które nazwano *Rochalimaea henselae*. Przy okazji, badacze ci potwierdzili udział dwóch pałeczek *R. henselae* i *R. quintana* w patogenie naczyńniakowatości bakteryjnej. *R. quintana*, aktualnie zwana *Bartonella quintana*, jest również związana z innymi schorzeniami tj: endocarditis (zapalenie wsierdza), pericarditis (zapalenie nasierdza), chorobami zakrzepowo-zatorowymi, zapaleniem spojówek, bakteriecią, przewlekłą limfadenopatią i schorzeniami neurologicznymi [19, 40]. Choroby te diagnozowane są najczęściej u osób z grupy ryzyka, głównie z obniżoną odpornością, przewlekłymi chorobami (nowotwory, cukrzyca, alkoholizm), obniżonym standardem sanitarnym i życiowym (ludzie bezdomni i biedni) [35]. Podobnie *R. henselae*, zwana obecnie *Bartonella henselae* odpowiedzialna jest za liczne schorzenia, w tym chorobę kociego pazura – Cat scratch disease (CSD).

Tabela I

Systematyczna przynależność bakterii *Bartonella* spp.

Takson	Klasyfikacja do 1995 roku			Klasyfikacja po 1995 roku
Rząd	<i>Rickettsiales</i>			<i>Rhizobiales</i>
Rodzina	<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Bartonellaceae</i>		<i>Bartonellaceae</i>
Rodzaj	<i>Rochalimaea</i>	<i>Grahamella</i>	<i>Bartonella</i>	<i>Bartonella</i>
Gatunki	<i>R. quintana</i> <i>R. vinsonii</i> <i>R. henselae</i> <i>R. elizabethae</i>	<i>G. talpae</i> <i>G. peromysci</i>	<i>B. bacilliformis</i>	<i>B. quintana</i> , <i>B. capreoli</i> , <i>B. schoenburchensis</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> , <i>B. washoensis</i> , <i>B. alsatica</i> , <i>B. henselae</i> , <i>B. bovis</i> , <i>B. koehlerae</i> , <i>B. doshiae</i> , <i>B. grahamii</i> , <i>B. elizabethae</i> , <i>B. clarridgeiae</i> , <i>B. talpae</i> , <i>B. peromysci</i> , <i>B. birtlesii</i> , <i>B. tribocorum</i> , <i>B. taylorii</i> , <i>B. chomelii</i> , <i>B. rochalimae</i> , <i>B. weissi</i> , <i>B. bacilliformis</i> , <i>B. rattimassiliensis</i> , <i>B. phoceensis</i>

3. Przynależność systematyczna pałeczek *Bartonella* sp.

W wydaniu Beregey's Manual of Systematic Bacteriology z roku 1984, rząd *Rickettsiales* został podzielony na 3 rodziny: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* i *Anaplasmataceae*. Rodzina *Rickettsiaceae* zawierała trzy rodzaje *Rickettsia*, *Coxiella* i *Rochalimaea*, do którego należały tylko dwa gatunki: *R. quintana* i *R. vinsonii*. Bakteria *Bartonella bacilliformis* była jedynym gatunkiem rodzaju *Bartonella*, który wraz z rodzajem *Grahamella* tworzył rodzinę *Bartonellaceae* [48]. Taki podział budził jednak kontrowersje, gdyż bakterie z rodzaju *Rochalimaea*, choć morfologicznie bardzo przypominają riketsje, wykazują odmienne właściwości fenotypowe i genetyczne. Bartonele, w odróżnieniu od ścisłych pasożytów wewnątrzkomórkowych, mogą rosnąć w warunkach sztucznych na podłożach bezkomórkowych. Ponadto w gatunkach należących do rodzaju *Rickettsia*, określanych jako prawdziwe riketsje, zawartość guaniny i cytozyny (G+C) w genomie wynosi od 28,5 mol% do 33,3 mol%, podczas gdy u bakterii *Rochalimaea* sp. i z rodziny *Bartonellaceae* ten procent jest nieco wyższy i wynosi od 39,0 mol% do 41,0 mol% [11]. Reklasyfikacja w obrębie riketsji nastąpiła po wprowadzenie metod biologii molekularnej w badaniach taksonomicznych bakterii. Nowe narzędzia badawcze pozwoliły na zidentyfikowanie nowych gatunków bartoneli i zmodyfikowanie systematyki riketsji. W 1992 roku, rodzaj *Rochalimaea* powiększył się o dwa kolejne, nowe gatunki *R. henselae* i *R. elizabethae*. Za pomocą hybrydyzacji DNA-DNA określono wysokie pokrewieństwo *Rochalimaea* z gatunkami *Bartonella* sp. [11]. Brenner i wsp. w roku 1993 wysunęli propozycję taksonomicznego połączenia tych dwóch rodzajów pałeczek. Badacze ci w badaniach porównawczych genotypu, fenotypu i filogenezy wykazali istotne różnice pomiędzy pałeczkami z rodzaju *Bartonella/Rochalimaea*, a innymi bakteriami z rzędu *Rickettsiales*. Zaproponowano również przeniesienie rodzaju *Bartonella* z rzędu *Rickettsiales* do

rzędu *Rhizobiales*. W nowej systematyce rodzaj *Bartonella* zawierał, oprócz *B. bacilliformis*, dodatkowo cztery gatunki wcześniej przynależące do rodzaju *Rochalimaea* tj.: *B. quintana*, *B. vinsonii*, *B. henselae* i *B. elizabethae*. Od połowy lat 90 izolowano i opisano kolejne nowe gatunki m.in.: *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* (izolowany z psa), *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella koehlerae* i *Bartonella weissii* (z kota), *Bartonella tribocorum* (z gryzoni), *Bartonella alsatica* (z królika, *Oryctolagus caniculus*), *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* (z bydła) czy *Bartonella washoensis* (od człowieka) [9]. W roku 1995 Birtles i wsp. w oparciu o analizę filogenetyczną stwierdzili wysokie pokrewieństwo gatunków z rodzaju *Grahamella* z pałeczkami *Bartonella* sp. i zaproponowali włączenie tych gatunków do rodzaju *Bartonella* [6]. Rodzaj *Bartonella* powiększył się o gatunki *B. talpae*, *B. peromysci*, *B. grahamii*, *B. taylorii* i *B. doshiae* (Tab. I). Trzy ostatnie gatunki były izolowane od zwierząt dzikich,

Tabela II
Geny proponowane w detekcji grup pałeczek *Bartonella* sp. [26]

Grupa	Gatunek	Geny
A	<i>B. bacilliformis</i>	16S rRNA, <i>ITS</i> , <i>gltA</i>
B	<i>B. clarridgeiae</i>	<i>ITS</i> , <i>groEL</i>
C	<i>B. henselae</i> <i>B. quintana</i> <i>B. koehlerae</i>	<i>groEL</i> , <i>gltA</i>
D	<i>Bartonella</i> sp. R-PHY1, <i>Bartonella</i> sp. SH8200GA, <i>Bartonella</i> sp. OP6399GA, <i>Bartonella</i> sp. RR11755TX	<i>gltA</i>
E	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i> <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	<i>ITS</i> , <i>groEL</i> , <i>gltA</i>
F	<i>B. elizabethae</i> <i>B. grahamii</i> <i>B. tribocorum</i> <i>Bartonella</i> sp. C5RAT <i>Bartonella</i> sp. MM5136CA	16S rRNA, <i>ITS</i> , <i>groEL</i> , <i>gltA</i>
nie-sklasyfikowane	<i>B. doshiae</i> <i>B. taylorii</i> <i>B. alsatica</i>	brak danych

głównie ssaków [6]. W roku 2001 Houpijian i wsp. opracowali drzewo filogenetyczne dla *Bartonella* sp. w oparciu o analizę czterech genów tj. 16S rRNA, sekwencję międzygenową 16S/23S (*ITS*) oraz genów kodujących syntetazę cytrynianową (*gltA*) i białko szoku termicznego o masie 60 kDA (*groEL*) [26]. W otrzymanym dendrogramie wyróżniono 6 grup o istotnym znaczeniu ewolucyjnym. Do grupy pierwszej (A) zaklasyfikowano *B. bacilliformis*, do drugiej (B) *B. clarridgeiae*, do trzeciej (C) trzy gatunki *B. henselae*, *B. quintana* i *B. koehlerae*. W grupie D znalazło się 9 gatunków *Bartonella* sp. związanych z gryzoniami rodzimymi dla obu Ameryk. Natomiast pozostałe gatunki wprowadzono do grupy E: *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* i *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* oraz do grupy F: *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. tribocorum*

i siedem odmian związanych z gryzoniami Starego Świata (Europy, Azji i Afryki) (Tab. II) [26]. Obecnie bakterie z rodzaju *Bartonella* zalicza się do α -podgromady *Proteobacteria* i są genetycznie spokrewnione z takimi gatunkami jak *Brucella abortus*, *Agrobacterium tumefaciens* oraz z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*. Podobieństwo pomiędzy *Bartonella* sp. i *A. tumefaciens* wynika m.in. z mechanizmów patogenności. *Bartonella* sp. podobnie jak *Agrobacterium tumefaciens* wnika do komórek żywiciela i indukuje proliferację komórek oraz przyczyniają się do rozrost tkanek żywiciela (hipertrofii) [47]. Aktualnie znane są 24 gatunki bartonelli, wśród których 14 ściśle związanych jest z zakażeniami u ludzi (Tab. III). Wśród nich znalazły się gatunki żywicielsko powiązane z kotami (*B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*), psami

Tabela III

Występowanie gatunków z rodzaju *Bartonella* oraz ich wektory i rezerwuary [27, 40, 46]

Gatunek	Występowanie	Rezerwuar/żywiciel przypadkowy	Wektor
<i>B. clarridgeiae</i> *	cały świat	kot/człowiek	pchła kocia (<i>Ctenocephalides felis</i>)
<i>B. henselae</i> *	cały świat	kot, mysz zaroślowa (<i>Apodemus sylvaticus</i>)/człowiek	pchła kocia
<i>B. quintana</i> *	cały świat	człowiek	ludzka wesz odzieżowa (<i>Pedicular humanis</i>)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i> *	cały świat	pies, kojot, jenot/człowiek	kleszcz <i>Ixodes</i> sp., pchła (prawdopodobnie)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> *		myszak (<i>Peromyscus leucopus</i>)	kleszcz jelenia (<i>Ixodes scapularis</i>)
<i>B. elizabethae</i> *	Europa	szczur wędrowny (<i>Rattus norvegicus</i>)/człowiek	pchła szczurza (<i>Xenopsylla cheopis</i>)
<i>B. tribocorum</i>	Europa	szczur wędrowny	pchła szczurza
<i>B. alsatica</i> *	Francja	królik/człowiek (prawdopodobnie)	nieznany
<i>B. birtlesii</i> *, <i>B. rattimassiliensis</i> *, <i>B. phoceensis</i> *	Francja	szczur wędrowny	pchła szczurza
<i>B. washoensis</i> *		wiewiórka ziemna (<i>Spermophilus beecheyi</i>)/człowiek	<i>Ctenophthalmus nobilis</i>
<i>B. doshiae</i>	Europa, gł. Wielka Brytania	normik bury (<i>Microtus agrestis</i>)	<i>Ctenophthalmus nobilis</i>
<i>B. taylorii</i> *	Europa, gł. Wielka Brytania	mysz (<i>Apodemus</i> sp.)	<i>Ctenophthalmus nobilis</i>
<i>B. grahamii</i> *	Europa, gł. Wielka Brytania	normica ruda (<i>Clethrionomys glareolus</i>) mysz leśna (<i>Apodemus flavicollis</i>) szczur (<i>Rattus</i> sp.), mysz domowa (<i>Mus musculus</i>)/człowiek	pchła szczurza (<i>Ctenophthalmus nobilis</i>)
<i>B. talpae</i>	Wielka Brytania	kret (<i>Talpa europea</i>)	nieznany
<i>B. weissii</i>	Francja, Stany Zjednoczone	jeleniowate, bydło/kot	
<i>B. peromysci</i>	Stany Zjednoczone	myszak	
<i>B. koehlerae</i> *	Kalifornia (USA)	kot/człowiek	pchła kocia?
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Kanada	normica (<i>Clethrionomys</i> sp.)	roztocza (<i>Trombicula mironi</i>)
<i>B. bacilliformis</i> *	Peru, Ekwador, Kolumbia, Boliwia, Chile i Gwatemala	człowiek	muszka piaskowa (<i>Lutzomyia</i> sp.)

Objaśnienia: * – wykazano związek z chorobotwórczością u człowieka

(*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*) oraz gryzoniami zasiedlającymi tereny zurbanizowane (*B. elizabethae*, *B. wushoensis*, *B. taylori*, *B. grahamii*, *B. rattimassiliensis*, *B. phoceensis*, *B. birtlesii*).

4. Charakterystyka pałeczek z rodzaju *Bartonella*

Bakterie z rodzaju *Bartonella* to tlenowe, Gram-ujemne pałeczki przeważnie o długości od 1.0 μm do 1.7 μm i szerokości 0.3 μm – 0.5 μm . Często komórki te mogą być lekko wygięte lub pleomorficzne w postaci ziarniakopaleczek, rzadziej ziarniaków [46]. Liczne gatunki *Bartonella* sp. wykazują hemotropię i pasożytują wewnątrz erytrocytów ssaków, w tym człowieka. *Bartonella* sp. są jednak fakultatywnymi wewnątrzkomórkowymi patogenami i wykazują zdolność do wzrostu zarówno w przestrzeniach międzykomórkowych jak i wewnątrzkomórkowych, głównie w śródbłonku naczyń krwionośnych i krwinkach czerwonych [46]. Prawie wszystkie drobnoustroje z rodzaju *Bartonella* sp. są nieurzęsione, z wyjątkiem szczepów *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. chomelii* i *B. capreoli*. Antygeny rzęskowe u *B. bacilliformis*, podobnie jak u innych urzęsionych pałeczek *Bartonella* sp., wykazują właściwości adhezyjne i dodatkowo umożliwiają penetrację bakterii do wnętrza erytrocytów [42]. W tym przypadku rzęski są prawdopodobnie ważnymi strukturami powierzchniowymi odpowiedzialnymi za czynny i swoisty mechanizm wnikania bakterii do komórek żywiciela. Kolejnymi powszechnie występującymi strukturami zewnątrzkomórkowymi u wszystkich znanych pałeczek bartoneli są pille. Struktury fimbrialne, a także fimbriopodobne (BFP, bundle-forming pili) u tych pałeczek zlokalizowane są przeważnie na jednym biegunie komórki i uczestniczą m.in. w autoagregacji i adhezji bakterii do komórek żywiciela. Uznaje się je za jedne z istotnych czynników wirulencji u *Bartonella* sp., które są odpowiedzialne za wczesne etapy patogenezы [12, 42]. Najnowsze doniesienia wskazują, że za adhezję i kolonizację tych bakterii odpowiadają głównie białkowe adhezyny zlokalizowane na powierzchni ściany komórkowej Gram-ujemnych pałeczek. Rolę adhezyn pełnią bakteryjne białka wiążące macierz zewnątrzkomórkową (ECM – binding proteins, extracellular matrix-binding proteins), w tym niektóre białka OMP (outer membrane proteins), które uczestniczą w swoistej interakcji z receptorami na powierzchni komórek żywicielskich i internalizacji bakterii w procesie fagocytozy [16]. Wszystkie gatunki z rodzaju *Bartonella* charakteryzuje wolny metabolizm i brak zdolności do wytwarzania katalazy, ureazy, oksydazy oraz reduktazy azotanowej. *Bartonella* sp. są pałeczkami niefermentującymi, niezdolnymi do rozkładu glukozy.

Do wzrostu pałeczki te bezwzględnie wymagają bursztynianu i/lub pirogronianu, jako jedyne źródło energii i szkieletu węglowego oraz organicznego azotu w postaci glutaminy lub glutaminianu [20, 40, 47]. Powyższe cechy fenotypowe i właściwości wzrostowe pałeczek *Bartonella* sp. mogą być wykorzystane w diagnostyce bartoneli [20]. Wszystkie gatunki *Bartonella* rosną najlepiej na świeżych podłożach wzbogaconych, w środowisku wilgotnym i wzbogaconym o 5–10% CO_2 , w temperaturze 35°C, z wyjątkiem *B. bacilliformis* (25–28°C) [27]. Generalnie *Bartonella* sp. charakteryzuje się wolnym wzrostem w bezkomórkowych podłożach – średnio 12–14 dni, w przypadku *B. bacilliformis* nawet do 45 dni. Dlatego podczas trwania inkubacji zalecane jest stosowanie komory zapewniającej wysoką wilgotność sięgającą nawet 80%. Najlepszy wzrost tych pałeczek jest obserwowany po dodaniu do podłoża wzbogaconego bydłęcej surowicy krwi (FBS) lub krwi końskiej, króliczej lub baraniej oraz heminy [30]. Optymalne stężenie heminy dla podtrzymania wzrostu bartoneli wynosi od 50 $\mu\text{g/ml}$ do 250 $\mu\text{g/ml}$, przy wyższym stężeniu (500 $\mu\text{g/ml}$) hemina może działać hamująco [43]. Przy izolowaniu *Bartonella* sp. początkowo wyrastają kolonie drobne, białe, szorstkie, suche, lekko wyniesione, z zagłębieniem w środku i wrastające w podłoże mikrobiologiczne. Kolejne pasażowanie skraca czas wzrostu bakterii do 3–5 dni, a kolonie są gładkie, błyszczące, okrągłe, półprzezroczyste i nieadherujące do podłoża hodowlanego [27]. Bardzo dobry wzrost gatunków z rodzaju *Bartonella* uzyskuje się również stosując inne wzbogacone podłoża takie jak agar czekoladowy, krwawy agarze z wyciągiem sercowym (BHIAK), agar tryptozowo-sojowy (TSA), selektywny agar krwawy dla *Brucella* sp. (BBA) lub zmodyfikowane podłoże z dodatkiem ekstraktu owadziego, *Bartonella* Alpha-Proteobacteria Growth Medium (BAPGM) [2, 13, 43].

Rozmiar genomu poszczególnych gatunków *Bartonella* sp. mieści się w przedziale od $1,6 \times 10^6$ pz do 2×10^6 pz [48]. Dotychczas nie stwierdzono obecności plazmidów, chociaż niektóre gatunki jak *B. bacilliformis* i *B. henselae* mogą posiadać w genomie bakteriofagi [2, 35].

Budowa ściany komórkowej *Bartonella* sp. przypomina organizację strukturalną i funkcjonalną osłony zewnętrznej większości pałeczek gram-ujemnych, zwłaszcza riketsji z grupy durów plamistych oraz gorączek plamistych [35]. W obrębie błony zewnętrznej *Bartonella* sp. znajdują się liczne białkowe antygeny powierzchniowe odpowiedzialne za adhezję i ochronę przed fagocytozą komórek żernych oraz bakteriofagocytą – działaniem białek układu dopełniacza surowicy krwi [42]. W szczepach *B. henselae* zidentyfikowano liczne białka wiążące ECM (extracellular matrix), głównie fibronektynę (Fn), kolagen (Cn) typu IX i X oraz

lamininę [16]. Zasadniczo silne oddziaływania pomiędzy *B. henselae* a komórką endotelialną zachodzą w obecności białek wiążących fibronektynę (FnBPs, fibronectin binding proteins). W szczepach tych opisano trzy główne takie białka określane jako Pap31, Omp43 i Omp89. Białka te należą do białek zewnętrznej błony komórkowej i są najważniejszymi czynnikami wirulencji *B. henselae*. Umożliwiają one adhezję i inwazję do różnych typów komórek zawierających domeny wiążące heparynę oraz kolagen w fibronektynie [16]. Podobny mechanizm wirulencji wykazują również inne chorobotwórcze mikroorganizmy takie jak *Treponema pallidum*, *Mycobacterium* sp., *Staphylococcus aureus* czy *Listeria monocytogenes* [16]. W szczepach *B. quintana* również stwierdzono występowanie wielofunkcyjnych białek OMP, wśród nich białek Vmps odpowiedzialnych za autoagregację bakterii i wiązanie się z kolagenem [49]. Istnieje także uzasadnione przekonanie wśród badaczy, że zmienność antygenowa, jako konsekwencja poziomu ekspresji genów kodujących białka OMP, w szczepach *Bartonella* sp. może mieć istotne znaczenie w procesach adhezji, kolonizacji i inwazji bakterii do komórek żywiciela [1, 16]. Natomiast w pałeczkach *B. bacilliformis* wykryto specyficzne białko OMP o masie cząsteczkowej 67 kDa, które uczestniczy we wczesnych etapach internalizacji bakterii do erytrocytów. Białko to jest główną adhezyną i jednocześnie powoduje deformację błon erytrocytarnych [12, 42]. Knobloch analizując błonę zewnętrzną *B. bacilliformis* scharakteryzował 14 białek o masie cząst. od 11.2 kDa do 160 kDa, z których aż 12 reagowało z surowicą od pacjentów z chorobą Carriona [28, 29]. Niektóre z tych białek swoiście reaguje z antygenami powierzchniowymi na erytrocytach, głównie spektrynami a/b i glikoforynami A/B. Natomiast białko o masie 75 kDa wiąże się głównie z komórkami epitelialnymi i wykazuje wysoką homologię strukturalną do białka regulującego cykle komórkowe, FtsZ [12]. Jednym z najlepiej poznanych białek w szczepach *Bartonella* sp. jest białko Bb65, które posiada wysoką homologię w sekwencji aminokwasowej z białkami szoku termicznego GroEL. Jednocześnie jest ono uznane za główny antygen powierzchniowy u *Bartonella* sp. [28]. Ponadto u *B. henselae* opisano dodatkowe immunogenne białko, które strukturalnie przypomina białko szoku termicznego – HtrA odpowiedzialne za procesy oksydatywne w czasie odczynu zapalnego w żywicielu [2].

5. Cykl rozwojowy i chorobotwórczość pałeczek *Bartonella* sp.

Gatunki z rodziny *Bartonellaceae* mają charakterystyczny cykl rozwojowy, w którym to uczestniczą żywiele i mniej lub bardziej swoiste wektory odpo-

wiedzialne za transmisję tych bakterii między żywicielami [26, 32]. Zazwyczaj w naturalnych żywicielach bakterie te wywołują chroniczną, często bezobjawową bakteremię z etapem pasożytowania wewnątrz erytrocytów. Ponadto występuje swoisty związek pomiędzy naturalnym żywicielem, wektorem, a gatunkiem bakterii z rodzaju *Bartonella*. Wektory determinują zasięg możliwych naturalnych bądź przypadkowych żywicieli oraz rozmieszczenie geograficzne pałeczek *Bartonella* sp. [26, 27]. Pałeczki z rodzaju *Bartonella*, z wyjątkiem *B. bacilliformis*, wykazują unikalną strategię przetrwania w żywicielu opartą na przystosowaniu do niehemolitycznej wewnątrzkomórkowej kolonizacji erytrocytów. Ta zdolność pozwala na wydajne przeniesienie bakterii przez krwiopijne wektory oraz na uniknięcie reakcji immunologicznej w makroorganizmie.

W cyklu rozwojowym bartoneli w żywicielu obserwuje się kilka faz [42]. Po wprowadzeniu bakterii *Bartonella* sp. do organizmu żywiciela, bakterie kolonizują i wnikają do tkanek nabłonkowych, w których się namnażają. Szczególną uwagę zwraca wyraźny tropizm tkankowy pałeczek z rodzaju *Bartonella*, zwłaszcza do komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Prawdopodobnie stanowią one pierwotną niszę bytowania dla tych mikroorganizmów, choć niewykluczone, że rolę tę mogą pełnić również inne typy tkanek. Opisano dwa możliwe mechanizmy wnikania bakterii *Bartonella* sp. do śródbłonna poprzez endocytozę lub alternatywnie w drodze reorganizacji aktywności w cytoszkieletu komórki żywiciela za pośrednictwem bliżej nieokreślonych receptorów [1, 12]. W powstałych w ten sposób fagosomach bakterie namnażają się, a następnie wnikają do cytoplazmy. W cyklu replikacyjnym bakterii towarzyszy jednoczesne wydzielanie do otoczenia czynników wzrostu, które pobudzają zakażone komórki do proliferacji [1, 12]. Wskutek hipertrofii tkanek powstają guzkowate struktury, często łudząco przypominające zmiany nowotworowe. Po okresie ok. 3–4 dni następuje bezpośrednie uwalnianie bakterii do krwi. Faza bakteriemii rozpoczyna się w 4–5 dniu od infekcji, w czasie której uwolnione bakterie przylegają do powierzchni błony cytoplazmatycznej erytrocytów [41, 42]. Sam mechanizm wnikania pałeczek *Bartonella* sp. do wnętrza krwinek czerwonych nie jest jeszcze znany, ale przypuszcza się, że w tym procesie uczestniczą białka OMP lub inne powierzchniowe antygeny bakteryjne takie jak rzęski oraz pille. Po wniknięciu do wnętrza erytrocytów następuje natychmiastowa wewnątrzkomórkowa replikacja bakterii. Obserwacje preparatów krwi przy pomocy TEM wykazały, że replikujące się bakterie znajdują się w charakterystycznych wakuolach otoczonych błoną erytrocytarną [42]. Podziały bakterii stają się wolniejsze po kilku dniach osiągając tzw. fazę plateau z 8 komórkami bakteryjnymi w erytrocycie. Zatrzymanie podziałów bakterii jest prawdopodobnie

jednym z mechanizmów przetrwania bartoneli w żywych krwinkach czerwonych. Zaprzymanie podziałów może również wynikać z wyczerpania się składników odżywczych lub z obecności czynników ograniczających wzrost bakterii wewnątrz erythrocytu [42]. Niezależnie od tego pałeczki *Bartonella* sp. mogą w ten sposób przebywać wewnątrz erythrocytów nawet przez kilka tygodni. Ponadto faza wewnątrzkomórkowa zwiększa szansę bakterii na pobranie i przeniesienie ich przez krwiopijnego stawonoga na nowego żywiciela. Ta unikalna strategia patogenności z pewnością przyczyni się do epidemiologicznego sukcesu *Bartonella* sp. w ich naturalnych żywicielach [41, 42]. Wyjątek stanowi *Bartonella bacilliformis*, która jako jedyny gatunek ma zdolność do hemolizy krwi. W odróżnieniu od pozostałych gatunków bakteria ta wytwarza lipofilne białko o masie cząsteczkowej 67 kDa zwane deforminą o aktywności hemolitycznej. Białko to powoduje deformację błony erythrocytarnej i lizę krwinek czerwonych wskutek utworzenia w błonach por i kanałów [12, 50]. Cykl życiowy *Bartonella* sp. związany z ich patogennością jest jednak wciąż niekompletny i wymaga dalszych obserwacji. Nie jasne jest również pojęcie pierwotnej niszy. Ponadto nie do końca są znane mechanizmy, które by pozwalały wnikać bakteriom do krwinek czerwonych oraz kontrolować wzrost i rozwój bakterii w zainfekowanych erythrocytach.

6. Epidemiologia bartonelozy

Geograficzne rozmieszczenie gatunków *Bartonella* jest bardzo zróżnicowane (Tab. III), z dużym ich zagęszczeniem w strefach klimatu ciepłego i gorącego. Niektóre szczepy występują niemalże na całym świecie, inne zaś ograniczają się do ściśle określonych obszarów geograficznych [2, 35]. Gatunki *B. henselae* i *B. quintana* są gatunkami kosmopolitycznymi i występują na całym świecie, co wiąże się z szerokim rozpowszechnieniem ich żywicieli (ludzie, koty) i wektorów (wszy odzieżowe, pchły) [26, 27, 32].

Kolejne gatunki takie jak *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. weissii* i *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* spotykane są w Europie i Stanach Zjednoczonych. Natomiast szczepy *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* i *B. koehlerae* stwierdzono wyłącznie w Ameryce Północnej i Południowej, a *B. grahamii*, *B. taylorii*, *B. doshiae*, *B. tribocorum*, *B. birtlesii* i *B. alsatica* tylko w Europie [26, 27].

Gatunek *B. bacilliformis* występuje jedynie na endemicznych obszarach Ameryki Południowej, głównie w Andach (Peru, Kolumbia i Ekwador) [26, 27]. Dystrybucja tych gatunków w przyrodzie niewątpliwie związana jest z rozmieszczeniem ich żywicieli i/lub wektorów odpowiedzialnych za transmisję bartonelozy.

Muszka piaskowa, *Lutzomyia verrucarum* jest jedynym wektorem dla *B. bacilliformis* i występuje tylko w ściśle określonych obszarach Ameryki Południowej, gdzie występują odpowiednie dla jej rozwoju warunki klimatyczne [27].

Wszystkie pałeczki *Bartonella* sp. wymagają żywicieli (ssaków), w których wywołują bezobjawową bakteriemię. Na podstawie analizy sekwencji genów 16SrRNA, 16S/23S wewnątrzgenowych regionów ITS, *gltA* i *groEL* w różnych szczepach bakterii z rodzaju *Bartonella* wykazano, że tworzą one filogenetycznie powiązane grupy [26]. Każdy gatunek bakterii w obrębie danej grupy posiada swoistego żywiciela. Ta bliska korelacja pomiędzy bakteriami, a ich ssaczymi rezerwuarami potwierdza hipotezę, że są to związki gatunkowo-swoiste [9, 26]. Człowiek jest naturalnym rezerwuarem dla dwóch gatunków: *B. bacilliformis* i *B. quintana*, ale również może być przypadkowym żywicielem dla innych gatunków *Bartonella* sp. żywicielsko związanych z kotami (*B. henselae*, *B. clarridgeiae*), psami (*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*) i drobnymi gryzoniami (*B. grahamii*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*) [9, 26].

Zakażenie wywołwane przez te bakterie u człowieka mogą przebiegać w dwóch postaciach klinicznych przewlekłej lub ostrej, w zależności od statusu odpornościowego człowieka. U osób immunokompetentnych infekcja ta przebiega przeważnie miejscowo i asymptomatycznie [27]. Przykładem może być choroba kociego pazura (CSD) wywołwana przez pałeczki *B. henselae*, która u ludzi zdrowych występuje w postaci lokalnej limfadenopatii [9]. W tych przypadkach bakteriemia jest notowana bardzo rzadko. U osób z obniżoną odpornością, bartonelozy przebiegają w postaci bakteriemii, schorzeń systemowych z uszkodzeniem naczyń krwionośnych w naczyniakowości (BA) lub wątroby w plamicy wątrobowej (PH) [5, 27]. Głównym rezerwuarem dla *B. henselae* są przede wszystkim koty zarówno dziczące jak i domowe [3]. Obecnie wiadomo, że koty również mogą być zakażone innymi gatunkami *Bartonella* sp., takimi jak *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* i *B. weissii* [9]. Bezobjawowe przewlekłe bakteriemie u kotów notuje się na całym świecie. Pałeczki *B. henselae* stwierdza się w krwiobiegu, zwłaszcza w erythrocytach, gdzie mogą pozostać przez kilka miesięcy, a nawet do roku czasu [9]. Przypuszczalnym mechanizmem wzajemnej infekcji kotów i transmisji pałeczek *Bartonella* sp. są ugryzienia przez zainfekowane pchły kocie (*C. felis*) lub wtarcie odchodów pcheł w uszkodzoną skórę lub błonę śluzową [9]. Obecnie opisano dwa główne serotypy/genotypy *B. henselae*: Houston i Marseille, przy czym pierwszy typ powszechnie występuje w USA, a drugi w Europie. Notowane są przypadki koinfekcji obu typów *B. henselae* u kotów, niezależnie od szerokości geograficznej [4].

Tabela IV

Chorobotwórczość *Bartonella* sp. u ludzi i drogi przenoszenia bartoneloz [25, 40, 46]

Choroba	Dystrybucja	Czynnik etiologiczny	Droga przenoszenia
Gorączka okopowa (trench fever)	cały świat	<i>B. quintana</i>	człowiek–człowiek poprzez wektor wesz odzieżową (<i>P. humanus</i>)
Choroba Carriona	tereny endemiczne (Góry Andy)	<i>B. bacilliformis</i>	człowiek–człowiek poprzez wektor <i>L. verrucarum</i>
Choroba kociego pazura (Cat scratch disease, CSD)	cały świat	<i>B. henselae</i> , <i>B. clarridgeiae</i> , <i>B. quintana</i> <i>B. elizabethae</i>	bezpośrednio kot–człowiek lub poprzez wektor – pchłę kocią (<i>C. felis</i>) bezpośrednio szczur–człowiek (rzadko)
Plamica wątrobowa (peliosis hepatitis, PH)	cały świat	<i>B. henselae</i> <i>B. quintana</i>	kot–człowiek (pośrednio lub bezpośrednio) człowiek–człowiek poprzez wektor wesz odzieżową
Naczyniakowatość bakteryjna (bacillary angiomatosis, BA)	cały świat	<i>B. quintana</i> <i>B. henselae</i>	człowiek–człowiek (wektor <i>P. humanus</i>) kot–człowiek (pośrednio lub bezpośrednio)
Zapalenie wsierdza (endocarditis)	cały świat	<i>B. quintana</i> , <i>B. henselae</i> Rzadko <i>B. koehlerae</i> , <i>B. elizabethae</i> <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i> , <i>B. taylorii</i> , <i>B. washoensis</i> <i>B. rattimarssiliensis</i>	człowiek–człowiek poprzez wektor wesz odzieżową kot–człowiek, pies–człowiek lub gryzonie–człowiek poprzez wektory pchły i kleszcze
Bakteriemia z gorączką	cały świat	<i>B. quintana</i> , <i>B. henselae</i> <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> , <i>B. grahamii</i>	człowiek–człowiek poprzez wektor wesz odzieżową (<i>P. humanus</i>) kot–człowiek (pośrednio lub bezpośrednio) gryzonie–człowiek (pośrednio i bezpośrednio)

Kolejnym gatunkiem kosmopolitycznie występującym u kotów jest *B. clarridgeiae*, który często uczestniczy w koinfekcjach wraz z *B. henselae* [25]. Pałeczkę tę najczęściej wykrywa i izoluje się we Francji, Holandii i na Filipinach (30–36%) oraz w południowo-wschodniej części Stanów Zjednoczonych, Japonii i na Tajwanie (<10%) [9]. Nie stwierdzono występowania *B. clarridgeiae* w innych państwach Europy, Australii i północnej Afryce [15]. Natomiast szczepy *B. koehlerae* były dotychczas izolowane sporadycznie z kotów w Kalifornii, Izraelu i we Francji [9, 15].

Rezerwuarem i źródłem transmisji bartoneloz mogą być także inne kotowate [37, 51]. Szczepy *B. henselae* izolowano m.in. z krwi gepardów (*Acinonyx jubatus*), panter (*Puma concolor coryi*) i kugarów, *B. henselae* odmiana Humboldt zaś z krwi górskich lwów w Kalifornii [51]. Bakteria *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* po raz pierwszy została wyizolowana z psa domowego. Pałeczka ta podobnie jak inne gatunki *B. clarridgeiae* i *B. washoensis* odpowiadają za rozwój zapalenia wsierdza u psowatych (psy domowe i dziczące) [10]. Prewalencja *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* u psów jest różna i waha się w szerokich granicach od <5% w krajach Europy do 65% w Sudanie [17]. Badania seroepidemiologiczne wykazały, że czynnikiem zwiększającym ryzyko zakażenia psów *B. vinsonii* jest ich narażenie na ugryzienie przez zainfekowane kleszcze [10]. Często gatunek ten towarzyszy *B. henselae* powodując koinfekcje zarówno u psów jak i u ludzi [13].

Znaczną część żywicieli dla atypowych pałeczek *Bartonella* sp. stanowią małe gryzonie tj. kret, nornica, mysz, nornik, myszak, wiewiórka i szczur oraz zwierzyzna płowa (Tab. IV). Częstość występowania *Bartonella* sp. w różnych żywicielach jest stosunkowo wysoka. W badaniach epidemiologicznych w Wielkiej Brytanii oszacowano występowanie przewlekłej i asymptomatycznej bakteriemi na 15% u jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus*), 90% u mulaka (*Odocoileus hemionus*) i około 50% u bydła domowego (*Bos taurus*) [9]. Analiza częściowych sekwencji genu syntetazy cytrynianowej, *gltA*, u bakterii wyizolowanych z tych zwierząt wykazała, że są one blisko spokrewnione z *Bartonella weissii* [8].

7. Bartonelozy jako choroby wektorowe i odzwierzęce (zoonozy)

Większość chorób wywoływanych przez bakterie z rodziny *Bartonellaceae* u ludzi i zwierząt jest przenoszona przez stawonogi, głównie owady krwiopijne: pchły, wszy, muszki, a także pajęczaki (roztocza i kleszcze) (Tab. III). Pierwszym odkrytym jeszcze przed I wojną światową wektorem bartoneloz była ludzka wesz odzieżowa. Uznano ją za najważniejszy biologiczny wektor przenoszenia gorączki okopowej między ludźmi [32]. Obecnie gorączka okopowa pojawia się sporadycznie na terenach endemicznych lub

w środowiskach o niskim standardzie życiowym i poziomie higieniczno-sanitarnym. Z tego względu zakażenia *B. quintana* są stale notowane na całym świecie, niezależnie od poziomu rozwoju gospodarczego państwa [27]. Rolę w transmisji bartoneloz u ludzi odgrywają także pchły, głównie pchła kocia (*Ctenocephalides felis*) będąca wektorem dla *B. henselae*. Ostatnio dowiedziano, że pchły mogą być nośnikami nawet kilku gatunków bartoneli. Przykładem może być pchła pasożytująca na gryzoniach (*Ctenophthalmus nobilis*), która jest wektorem dla co najmniej dwóch gatunków *Bartonella*: *B. grahamii* i *B. taylorii* oraz pchła kocia dla *B. henselae* i *B. clarridgeiae* [21]. Inne gatunki pcheł takie jak pchły szczurze (*Xenopsylla cheopis*) i psie (*Ctenocephalides canis*) odrywają istotną rolę w przenoszeniu *Bartonella* sp., zwłaszcza wśród zwierząt. Nie ma pełnych dowodów na ich bezpośredni udział w zakażeniach u ludzi [7]. Brak jest również danych dotyczących częstości zakażenia bartonelami pcheł psich i ich roli jako wektorów w transmisji bartoneloz wśród psowatych. O przenoszenie *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* wywołującej zapalenie wsierdzia u psów podejrzewa się przede wszystkim kleszcze, a nie pchły [7]. Mechanizm wnikania bartoneli do żywiciela za pośrednictwem wektora jest wciąż niejasny. W dotychczasowych badaniach epidemiologicznych udowodniono, że najczęściej do zakażenia pałeczkami *Bartonella* sp. u zwierząt, a niekiedy u ludzi, dochodzi w trakcie wtarcia w uszkodzoną skórę lub błonę śluzową (spojówkę oka) odchodów zainfekowanych bartonelami pcheł lub kleszczy [23]. Rzadko są to zakażenia spowodowane pogryzieniem czy ukłuciem przez zainfekowany wektor [9]. Możliwa jest również bezpośrednia transmisja pałeczek bartoneli wśród ssaków.

Przyjmuje się, że najczęściej rozpoznawaną postacią bartonelozy u ludzi na całym świecie jest choroba kociego pazura (CSD) [14, 46]. Mogą ją wywoływać liczne gatunki *Bartonella* sp. (*B. clarridgeiae*, *B. quintana* czy *B. elizabethae*), ale najczęstszym czynnikiem etiologicznym jest *B. henselae* [14, 31, 46]. Z danych epidemiologicznych wynika, że bakteria ta z dużą częstością jest przenoszona bezpośrednio z kota na inny organizm (kota, człowieka lub innego ssaka) wskutek pogryzienia, pokąsania, podrapania lub poślinienia [2, 9, 18]. Badania wykazały, że w Polsce zakażonych jest ponad 80% kotów, natomiast w innych krajach Europy Zachodniej wartości te są znacznie niższe (Holandia – 22%, Dania – 27%) [7, 46]. Mimo, że CSD może występować u ludzi w każdym wieku, to większość przypadków infekcji obserwuje się u pacjentów poniżej 18 roku życia [18]. Przypuszczalnym czynnikiem zwiększającym ryzyko choroby kociego pazura w tej grupie wiekowej jest częstszy i bliższy kontakt człowieka z zakażonymi kotami.

8. Bartonelozy u ludzi

Bakterie z rodzaju *Bartonella* mogą być przyczyną wiele schorzeń i powikłań u ludzi, takich jak: gorączka okopowa, choroba Carriona, choroba kociego pazura, płamica wątrobowa, naczyniakowatość bakteryjna, przewlekłe zapalenie węzłów chłonnych, zapalenie wsierdzia i mięśnia sercowego czy bakteriemia z gorączką (Tab. IV) [15, 19, 24, 38, 46]. Przebieg infekcji bartonelozowych u ludzi zależy od sposobu i miejsca wnikania bakterii oraz od stanu odporności żywiciela. Częstym powikłaniem bartoneloz u ludzi jest zapalenie wsierdzia (endocarditis). Schorzenie to może być powodowane przez różne gatunki bartoneli, głównie *B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* i *B. vinsonii* subsp. *arupensis* [27]. Śmiertelność w przypadku zakażeń tymi bakteriami jest niska, ale wzrasta u osób z obniżoną odpornością (np. AIDS, hipogammaglobulinemia), u pacjentów z chorobami przewlekłymi (nowotwory, cukrzyca, niewydolność narządowa, choroba alkoholowa, neuropatie) i z chorobami naczynio-sercowymi oraz u osób poddawanych immunosupresji [2, 5].

Choroba Carriona jest endemiczną bartonelozą ludzi wywołowaną przez *B. bacilliformis*. Do zakażenia *B. bacilliformis* dochodzi w wyniku wprowadzenia tych bakterii przez muszkę piaskową *Lutzomyia verrucarum* do organizmu człowieka [39]. Pałeczki *B. bacilliformis* w pierwszej kolejności lokalizują się w komórkach śródbłonna naczyń włosowatych. W nich bakterie inicjują podziały komórek żywiciela w wyniku, czego dochodzi do rozrostu tkanki naczyniowej. Etap ten często przebiega bezobjawowo [12, 34]. Dopiero w momencie wniknięcia *B. bacilliformis* do wnętrza erytrocytów pojawiają się silne reakcje zapalne w organizmie. Część zainfekowanych krwinek czerwonych jest pochłaniana przez makrofagi i histocyty, a pozostałe ulegają hemolizie w łożysku naczyniowym. Z powodu masowego rozpadu erytrocytów we krwi obwodowej rozwija się ciężka anemia hemolityczna kończąca się nawet śmiercią organizmu. Jest to tzw. ostra faza choroby Carriona, zwana potocznie gorączką Oroy'a. W większości przypadków gorączce Oroy'a towarzyszą oportunistyczne zakażenia jelitowe, zwłaszcza wywoływane przez pałeczki z rodzaju *Salmonella*. Nieleczona ostra choroba Carriona z wtórnymi zakażeniami niemalże w 100% prowadzi do śmierci żywiciela [34]. Natomiast przetrwałe zakażenie przechodzi w chroniczną często symptomatyczną postać bakteriemii. Faza przewlekła choroby Carriona jest w dalszym ciągu wysoce zakaźna i może trwać nawet ponad 15 miesięcy [27]. W chronicznym stadium tej choroby u ludzi pojawia się najpierw wysypka skórna, a następnie szpecące zmiany skórne tzw. brodawki peruwiańskie. Zmiany te powstają wskutek

hipertrofii zainfekowanych pałeczkami bartoneli tkanek podskórnych. Choroba Carriona pod taką postacią określana jest jako brodawczakowatość peruwiańska – Verruga Perruana [42]. Choroba ta ma jednak ograniczony zasięg geograficzny. Większość przypadków tej choroby występuje na obszarach suchych na wysokościach od 500 metrów do 3000 metrów nad poziomem morza, głównie w Andach peruwiańskich pomiędzy południowo-zachodnią Kolumbią a środkowym Peru [27].

Człowiek jest jak dotąd jedynym znanym rezerwuarem dla *B. bacilliformis* [34]. Najczęstszą postacią bartonellozy na całym świecie jest choroba kociego pazura (CSD), przebiegająca zwykle pod postacią zapalenia i powiększenia lokalnych węzłów [7]. W miejscu wniknięcia bakterii pojawia się najpierw rumieniowata grudka, a następnie powiększenie i tkliwość okolicznych węzłów chłonnych. Wszystkie te objawy u osób immunokompetentnych, ustępują samoistnie zwykle po kilku tygodniach lub miesiącach [27]. Komplikacje takie jak: wysypka oraz schorzenia systemowe (zapalenie wątroby, śledziony i węzłów chłonnych oraz lityczne uszkodzenie kości) należą do rzadkości i występują u ok. 5% pacjentów, przede wszystkim u dzieci [2].

Do rzadkości nie należy również gorączka okopowa wywołwana przez *B. quintana*. Transmisja tych pałeczek do krwi człowieka następuje najczęściej w wyniku wtrącenia w uszkodzoną skórę odchodów zainfekowanego wektora, wszy odzieżowej (*P. humanus*). Człowiek jest obecnie jedynym dowiedzionym źródłem tej bakterii i stanowi prawdopodobnie jej naturalny rezerwuuar. Mimo, że *B. quintana* jest zwykle obserwowana we krwi pacjentów, infekcja może trwać przez bardzo długi czas bezobjawowo od 3 do 6 miesięcy, a nawet dłużej. Taka przewlekła bakteriemia przyczynia się do rozprzestrzeniania się bakterii w populacji ludzkiej w środowiskach o niskim standardzie socjalno-ekonomicznym i sanitarnym, głównie wśród ludzi bezdomnych [32, 35, 36, 44]. W infekcji pierwotnej *B. quintana* notuje się objawy przypominające typową infekcję wirusową tj. gorączkę, mięśniobóle, bóle stawów, silne bóle głowy, złe samopoczucie itp. Objawy te zwykle ustępują samoistnie, bez leczenia. W niektórych przypadkach mogą one powracać cyklicznie. Taka przedłużająca się bakteriemia *B. quintana* może mieć jednak wpływ na rozwój naczyńniakowatości bakteryjnej (BA) lub zapalenia wsierdza, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością [33]. Generalnie, naczyńniakowatość bakteryjna (BA) i płamica wątrobowa (PH) są schorzeniami związanymi z rozrostem tkanek i występują przede wszystkim u pacjentów z obniżoną odpornością, zwłaszcza wśród nosicieli wirusa HIV i chorych na AIDS [38]. Naczyńniakowatość bakteryjną wywołują najczęściej dwa

gatunki *B. henselae* i *B. quintana* [27, 46]. Istnieją jednak kliniczne i epidemiologiczne różnice pomiędzy BA wywołaną przez oba te gatunki. Podskórne zmiany chorobowe oraz lityczne uszkodzenia kości są silnie związane z infekcją *B. quintana*, czynnikiem gorączki okopowej [27]. Natomiast płamica wątrobowa jest wywoływana wyłącznie przez *B. henselae* [38].

Rzadko kiedy dochodzi do zakażenia centralnego układu nerwowego (zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia mózgu), które jest częściej obserwowane u pacjentów z obniżoną odpornością, głównie chorych na AIDS [27].

Leczenie zakażeń *Bartonella* sp. u ludzi zależy od statusu immunologicznego pacjenta, objawów klinicznych i biologii drobnoustroju. U pacjentów immunokompetentnych nie zaleca się chemioterapii, gdyż stosowanie antybiotyków lub chemioterapeutyków nie skraca ani czasu choroby ani nie prowadzi do poprawy stanu zdrowia tych pacjentów [40]. Antybiotykoterapia jest zalecana przede wszystkim u osób z obniżoną odpornością i chorych na przewlekłe schorzenia, w tym zapalenie wsierdza, BA i PH. Skuteczną ochroną przed zakażeniami *Bartonella* sp. są przede wszystkim działania zapobiegawcze i ograniczające drogi szerzenia bartoneloz. Do działań prewencyjnych należą:

- (i) poprawa warunków socjalno-bytowych i higieniczno-sanitarnych ludzi,
- (ii) odwszawianie i kontrola populacji wektorów będących nośnikami *Bartonella* sp. (insekty),
- (iii) monitorowanie liczebności populacji gryzoni, ważnego naturalnego rezerwuaru gatunków *Bartonella*,
- (iv) kontrola sanitarno-higieniczna i weterynaryjna zwierząt domowych zwłaszcza kotów i psów,
- (v) leczenie antybiotykami zakażonych kotów,
- (vi) natychmiastowe oczyszczanie wszelkich zadrapań i ugryzień wodą z mydłem oraz odkażanie antyseptykami,
- (vii) szczepienie zwierząt domowych [40].

Obecnie prowadzone są badania nad szczepionkami dla kotów, które mogłyby ograniczyć rozprzestrzenianie się choroby wśród zwierząt, a tym samym ryzyko zakażenia człowieka. Poważną przeszkodą w tych pracach jest ogromna różnorodność wyizolowanych *Bartonella* sp. nawet o tym samym genotypie. Przeprowadzone przez Yamamoto i wsp. badania wykazały, że odporność na zakażenie wywołane przez *Bartonella* sp. występuje tylko u tych kotów, które zaszczepione zostały homologicznymi gatunkami lub szczepami [51]. Ten brak krzyżowej odporności sugeruje, że każda szczepionka musiałaby zawierać wielorakie epitopy *Bartonella* sp., zważywszy na fakt, że najczęściej u kotów obserwuje się koinfekcję kilkoma gatunkami lub serotypami *Bartonella* sp. [7].

9. Podsumowanie

Wzrost zainteresowania bakteriami z rodzaju *Bartonella* wśród lekarzy i mikrobiologów przypada na drugą połowę XX wieku. Wcześniej uznawane były one za patogeny należące do przeszłości. W ciągu ostatnich 15 lat doszło do odkrycia kilkunastu nowych gatunków, reklasyfikacji rodziny, a wszystkie zakażenia wywołane przez te drobnoustroje uznano za zagrażające zdrowiu człowieka i zaliczono do tzw. chorób wyłaniających i odnawiających się („emerging and re-emerging diseases”). Obecnie znanych jest ok. 24 gatunków *Bartonella* spp. z czego 14 wywołuje zakażenia u ludzi, zwłaszcza z obniżoną odpornością. Część z nich stanowi także problem weterynaryjny, gdyż wywołują one choroby u zwierząt hodowlanych i domowych (psy, koty, bydło, króliki). Naturalnym rezerwuarem bartoneli są ssaki, głównie gryzonie i zwierzyzna płowa. Bartonelozy to przede wszystkim choroby wektorowe, w transmisji których szczególną rolę odgrywają stawonogi krwiopijne tj. muszki, wszy, pchły, kleszcze, rzadko roztocza. Ostatnie dowiedziano, że mogą być one przenoszone również bezpośrednio jako antropozoonoza, poprzez pogryzienie lub zadrapanie przez zakażone zwierzę (kot, szczur). Infekcja w naturalnych rezerwuarach prowadzi do wewnątrzerytrocytarnej bakteriemii i może wiązać się z licznymi klinicznymi objawami, w zależności od statusu immunologicznego żywiciela. Najczęściej u naturalnego żywiciela bartonelozy mają charakter bezobjawowy z chroniczną bakteriemią. W przypadku zakażeń wywołanych przez *Bartonella* sp. stosowanie leczenia antybiotykowego zaleca się jedynie w przypadku osób o obniżonej odporności. Zapobieganie zakażeniom poprzez poprawę warunków bytowych, sanitarno-higienicznych wśród bezdomnych i ubogich, ograniczanie liczebności populacji wektorów, czy profilaktyczne badania zwierząt domowych to wciąż jedyne działania prewencyjne. Obecnie trwają prace nad stworzeniem szczepionki przeciwko *Bartonella henselae* dla kotów, co znacznie zmniejszyłoby zachorowalność wśród tych zwierząt, minimalizując także groźbę zakażenia człowieka. Problem bartonelloz jest wciąż zagadnieniem nowym, w pełni niepoznanym. Metody wykrywania pałeczek *Bartonella* sp. są stale udoskonalane i standaryzowane. W diagnostyce tych bakterii proponuje się klasyczne techniki hodowlane obejmujące izolację i identyfikację bartoneli, pomocnicze techniki histologiczne, a także detekcję genów z użyciem PCR i hybrydyzacji DNA-DNA oraz badania serologiczne. Obecnie na całym świecie prowadzone są liczne badania dotyczące bakterii z rodziny *Bartonellaceae*. Wyraźne widać, że wraz ze wzrostem poziomu wiedzy dotyczącej biologii i ekologii tych bakterii coraz lepiej rozwijają się metody diagnostyki, leczenia i zapobiegania bartonelloz.

Piśmiennictwo

- Anderson B.: The interaction of *Bartonella* with endothelial cells and erythrocytes. *Trends in Microbiol.* **9**, 530–531 (2001)
- Anderson B., Neumann M.: *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 203–219 (1997)
- Anderson B., Sims K., Regnery R., Robinson L., Schmidt M.J., Goral S.: Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 942–948 (1994)
- Bergmann A.M., Schellekens J. F., Schouls L.M.: Predominance of two *Bartonella henselae* variants among CSD patients in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 254–260 (1996)
- Bernit E., Veit Y., La Scola B., Tissot-Dupont H., Gation J., Raoult D., Harle J.R.: *Bartonella quintana* and *Mycobacterium tuberculosis* coinfection in an HIV-infected patient with lymphadenitis. *J. Infect.* **46**, 244–246 (2003)
- Birtles R.J., Harrison T.G., Saunders N.A., Molyneux D.H.: Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 1–8 (1995)
- Boulouis H.J., Chang C., Rickie J.B., Kasten W., Chomel B.B.: Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet. Res.* **36**, 383–410 (2005)
- Breitschwerdt E., Sontakke S., Cannedy A., Hancock S.I., Bradley J.: Infection with *Bartonella weissii* and detection of nanobacterium antigens in a North Carolina beef herd. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 879–882 (2001)
- Breitschwerdt E., Kordick D.: *Bartonella* Infection in Animals: carriership, reservoir, potential pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 428–438 (2000)
- Breitschwerdt E., Kordick D., Malarkey D.E., Keene B., Hadfield T.L. Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 154–160 (1995)
- Brenner D.J., O'Connor S.P., Winkler H.H., Steigerwalt A.G.: Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea* and to remove the family *Bartonellaceae* from the Order *Rickettsiales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 777–786 (1993)
- Buckles E.L., McGinnis Hill E.: Interaction of *Bartonella bacilliformis* with human erythrocyte membrane proteins. *Microb. Pathogen.* **29**, 165–174 (2000)
- Cadenas M.B., Maggi R.G., Diniz P.P.V.P., Breitschwerdt K.T., Sontakke S., Breitschwerdt E.B.: Identification of bacteria from clinical samples using *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium. *J. Microbiol. Met.* **71**, 147–155 (2007)
- Chmielewski T., Podsiadły E., Tylewska-Wierzbiana S.: Presence of *Bartonella* spp. in various human population. *Pol. J. Microbiol.* **56**, 33–38 (2007)
- Chomel B.B., Boulouis H.J., Breitschwerdt E.: Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **224**, 1270–1279 (2004)
- Dabo S.M., Coner A.W., Saliki J.T., Anderson B.E.: Binding of *Bartonella henselae* to extracellular molecules: Identification of potential adhesions. *Microb. Pathogen.* **41**, 10–20 (2006)
- Davoust B., Drancourt M., Boni M.: Survey of seroprevalence of *Bartonella vinsonii*, *Ehrlichia canis* and *Coxiella burnetii* in dogs in southeast France, French Guyana, Martinique and Sudan. EUWOG-ASR Joint Meeting, France, 1999
- Demers D.M., Bass J.W., Vincent J.M., Person D.A., Noyes D.K., Staeger C.G.: Cat scratch disease in Hawaii: etiology and seroepidemiology. *J. Pediatr.* **127**, 23–26 (1995)

19. Drancourt M., Mainardi J.L., Brouqui P., Vandenesch F., Carta A., Lehnert F., Etienne J., Goldstein F., Acar J., Raoult D.: *Bartonella quintana* endocarditis in three homeless men. *N. Engl. J. Med.* **332**, 419–423 (1995)
20. Drancourt M., Raoult D.: Proposed tests for the routine identification of *Rochalimaea* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**, 710–713 (1993)
21. Engbaek K., Lawson P.A.: Identification of *Bartonella* species in rodents, shrews and cats in Denmark. *APMIS*, **112**, 336–341 (2004)
22. Etienne J., Ory D., Raoult D., Loire R., Beaune J.: Chlamydial endocarditis: a report on ten cases. *Eur. Heart. J.* **13**, 1422–1426 (1992)
23. Foil L., Andress E., Freeland R.L., Roy A.F.: Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* feces. *J. Med. Entomol.* **35**, 625–628 (1998)
24. Fournier P.E., Lelievre H., Eykyn S.J., Mainardi J.L., Marrie T.J., Brunel F.: Epidemiological and clinical features of *Bartonella* endocarditis: a case control study. *J. Med.* **80**, 245–251 (2001)
25. Gundi V.A.K.B., Davoust B., Khamis A., Boni M., Raoult D., La Scola B.: Isolation of *Bartonella rattimassiliensis* sp. nov. and *Bartonella phoceensis* sp. nov. from European *Rattus norvegicus*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3816–3818 (2004)
26. Houpiikian P., Raoult D.: Molecular phylogeny of the genus *Bartonella*: what is the current knowledge? *FEMS Microbiol. Lett.* **200**, 1–7 (2001)
27. 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)
28. Knobloch J., Schreiber M.: Bb65, a major immunoreactive protein of *Bartonella bacilliformis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**, 373–379 (1990)
29. Knobloch J., Białek R., Muller G., Asmus P.: Common surface epitope of *Bartonella bacilliformis* and *Chlamydia psittaci*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**, 427–433 (1988)
30. Koehler J.E., Quinn F.D., Berger T.G., LeBoit P.E., Tapero J.W.: Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1625–1631 (1992)
31. Kordick D.L., Hilyard E.J., Hadfield T.L., Wilson K.H., Steigerwalt A.G.: *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever and lymphadenopathy (CSD). *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1813–1818 (1997)
32. Kosoy M.Y., Saito E.K., Green D., Marston E.L., Jones D.C., Childs J.E.: Experimental evidence of host specificity of *Bartonella* infection in rodents. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.* **23**, 221–238 (2000)
33. Kostrzewski J.: The epidemiology of trench fever. *Bull. Acad. Pol. Sci.* **7**, 233–263 (1949)
34. Maguina C., Garcia P., Gotuzzo E., Spach D.: Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 772–779 (2001)
35. Maurin M., Raoult D.: *Bartonella (Rochalimaea) quintana* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 273–292 (1996)
36. McNee, J.W., Renshaw A., Brunt E.H.: Trench fever. *Br. Med.* **10**, 225–234 (1916)
37. Molia S., Chomel B.B., Kosten R.W., Leutenegger C.M., Steels B.R., Marker L., Martenson J.S.: Prevalence of *Bartonella* infection in wild African lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinomyx jubatus*). *Veter. Microbiol.* **100**, 31–41 (2004)
38. Perkocha L.A., Geaghan S.M., Yen B.T.S., Nishimura S.L., Chan S.P., Honda G., Goldman R.L.: Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatis in association with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1581–1586 (1990)
39. Relman D.A., Loutit J.S., Schmith T.M., Falkow S., Tompkins L.S.: The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1573–1580 (1990)
40. Rolain J.M., Brouqui P., Koehler J.E., Maguina C., Dolan M.J., Raoult D.: Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1921–1933 (2004)
41. Sarbet A., Schulein R., Dehio C.: Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp. *Int. J. Med. Microbiol.* **29**, 555–560 (2001)
42. Schulein R., Seubert A., Gille C., Lanz C.: Invasion and persistent colonization of erythrocytes: A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J. Exp. Med.* **193**, 1077–1086 (2001)
43. Schwartzman W.A., Nesbit C.A., Baron A.J.: Development and evaluation of a blood free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae*. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1882–1885 (1993)
44. Spach D.H., Kanter A.S., Dougherty M.J., Larson A.M., Coyle M.B., Brenner D.J., Matar G.M., Welch D.F., Root R.K.: *Bartonella quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N. Engl. J. Med.* **332**, 424–428 (1995)
45. Stoler M.H., Bonfiglio T.A., Steigbigel R.T., Pereira M.: An atypical subcutaneous infection associated with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.* **80**, 714–718 (1983)
46. Tylewska-Wierzbanowska S.: Bartonelozy – nowe zagrożenie dla zdrowia człowieka. Postępy w medycynie zakażeń. *Nowa Klinika*, **11**, 750–751 (2004)
47. Weisburg W.G., Woese C.R., Dobson M.E., Weiss E.: A common origin of rickettsiae and certain plant pathogens. *Science*, **230**, 556–558 (1985)
48. Weiss E., Moulder J.W.: The Rickettsias and Chlamydias. (w:) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1984, 1, s. 687–688
49. Zhang P., Chomel B.B., Schau M.K. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomps) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13630–13635 (2004)
50. Xu Y.H., Lu Z.Y., Ihler G.M.: Purification of deformin, an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* which causes deformation of erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1234**, 173–183 (1995)
51. Yamamoto K., Chomel B., Lowenstine L., Phillips L., Blackwell J., Kasten R.: Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in captive wild felids, California. *Epidemiol. Sante Anim.* **11**, 31–32 (1997)

**Tomasz Wołkowicz¹, Marcin Kadłubowski^{2*}
Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka¹, Waleria Hryniewicz^{2,3}**

¹ Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

² Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, tel. 0-22 851 46 70, email: kadlubek@cls.edu.pl

³ Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Wpłynęło w kwietniu 2008 r.

1. Charakterystyka *Haemophilus influenzae*. 2. Antybiotykoterapia zakażeń wywołanych przez *H. influenzae*. 3. Mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe. 3.1. Wytwarzanie β -laktamaz. 3.2. Zmiany w białkach PBP i fenotyp BLNAR. 3.3. Inne mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe. 4. Wielolekooporność. 5. Podsumowanie

Mechanisms of resistance of *Haemophilus influenzae* to β -lactam antibiotics

Abstract: *Haemophilus influenzae* is an important respiratory tract pathogen, which can cause numerous invasive and non-invasive infections. The major group of chemotherapeutics used in the treatment of infections caused by this species are β -lactam antibiotics, especially aminopenicillins and cephalosporines. The most common mechanism of resistance to these agents is the production of β -lactamase – an enzyme, which inactivates these antibiotics. In clinical strains of *H. influenzae*, TEM and ROB β -lactamases have been identified. Other mechanisms of resistance to β -lactams are mutations in the *ftsI* gene, which encodes penicillin-binding proteins – PBP3A and PBP3B. These mutations cause alterations in PBP3A and PBP3B and decrease their affinity to β -lactam antibiotics. Strains showing resistance to β -lactams through this mechanism are called Beta-Lactamase Negative (or Non-producing), Ampicillin Resistant (BLNAR). This phenotype is difficult to detect by standard microbiological methods. In Poland, the number of clinical respiratory *H. influenzae* isolates with BLNAR phenotype is rising. BLNAR phenotype can promote other mechanisms of antimicrobial resistance, such as efflux pumps or production of extended spectrum β -lactamases (ESBL), which do not play an important role, when existing in *H. influenzae* on their own.

1. Characteristics of *Haemophilus influenzae*. 2. Antibiotic therapy of infections caused by *H. influenzae*. 3. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. 3.1. β -lactamase production. 3.2. Alterations in PBP and BLNAR phenotype. 3.3. Other mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. 4. Multidrug resistance. 5. Summary

Słowa kluczowe: Antybiotyki, β -laktamy, BLNAR, *Haemophilus influenzae*, lekooporność

Key words: Antibiotics, β -lactams, BLNAR, *Haemophilus influenzae*, antimicrobial resistance

1. Charakterystyka *Haemophilus influenzae*

Rodzaj *Haemophilus* (z gr. „lubiący krew”) obejmuje piętnaście gatunków (oraz dwa dodatkowe nazywane hemofilusopodobnymi) [26], z których część stanowi ludzką fizjologiczną florę bakteryjną zasiedlającą głównie błony śluzowe górnych dróg oddechowych. Najistotniejszym klinicznie gatunkiem tego rodzaju jest *H. influenzae* (pałeczka hemofilna).

Po raz pierwszy bakterię tę wyizolował Richard Pfeiffer z płwociny chorych na grypę w 1892 roku i nazwał ją *Bacillus influenzae* [43]. Mylną nazwę gatunkową mikroorganizm ten zawdzięcza temu, iż był on uznawany za czynnik etiologiczny tej groźnej choroby. W 1918 roku zmieniono nazwę na *H. influenzae*. W Polsce jeszcze w 1927 roku używano nazwy prątki Pfeiffera albo *Bacillus influenzae Pfeiffer* [47].

Komórki tego gatunku są małymi, Gram-ujemnymi, nieruchliwymi, pleomorficznymi ziarniako-pałeczkami lub

pałeczkami. Bakterie te mają duże wymagania wzrostowe. Do wzrostu wymagają heminy lub hematyny (czynnik X) oraz NAD⁺ lub NADP⁺ (czynnik V).

W obrębie gatunku *H. influenzae* wyróżnia się szczepy wytwarzające otoczkę oraz szczepy bezotoczkowe (nietypowalne, NTHi, ang. Non-Typeable *Haemophilus influenzae*). Ze względu na budowę otoczki wyróżnia się 6 typów serologicznych oznaczonych kolejnymi literami alfabetu od a do f. Istnieje również inny podział przyjmujący jako kryterium właściwości biochemiczne drobnoustroju (wytwarzanie indolu, wytwarzanie ureazy czy dekarboksylazy ornitynowej) i rozróżniający 8 biowarów (biotypów) oznaczanych cyframi rzymskimi od I–VIII [18, 27, 44, 54].

Bakterie z gatunku *H. influenzae* mogą wywoływać zakażenia zlokalizowane, nieinwazyjne lub inwazyjne. Zakażenia nieinwazyjne występują zazwyczaj w obrębie układu oddechowego i zazwyczaj są wywołane przez szczepy bezotoczkowe. Do najważniejszych

* Autor korespondencyjny: Marcin Kadłubowski, Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, email: kadlubek@cls.edu.pl

postaci zakażeń o etiologii NTHi zalicza się zapalenie płuc, zapalenie ucha środkowego, zaostrzenia przewlekłego zapalenia oskrzeli oraz zapalenie zatok. Pałeczki hemofilne mogą też odpowiadać za zakażenia okołoporodowe.

Najczęstsze zakażenia inwazyjne są wywołane przez serotyp b pałeczek hemofilnych i są to zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (ZOMR), zapalenie nógłoni, posocznica, zapalenie stawów i kości, zapalenie tkanki podskórnej, zapalenie osierdza, zapalenie szpiku kostnego czy zapalenie płuc przebiegające z bakterie-mią. Zakażenia wywołane przez *H. influenzae* serotypu b (Hib) stanowią zdecydowaną większość (około 95%) chorób inwazyjnych powodowanych przez szczepy tego gatunku u dzieci pomiędzy 2 miesiącem a 5 rokiem życia w krajach, w których nie wprowadzono powszechnych szczepień przeciwko temu drobnoustrojowi.

2. Antybiotykoterapia zakażeń wywołanych przez *H. influenzae*

W leczeniu zakażeń wywołanych przez *H. influenzae* kluczową rolę odgrywają antybiotyki β -laktamowe. Z grupy penicylin, w leczeniu chorób o etiologii *H. influenzae* ważne miejsce zajmują aminopenicyliny takie, jak ampicylina czy amoksyacylina. Aktywne wobec bakterii są też ureidopenicyliny np. piperacylina. Wszystkie te antybiotyki są podatne na rozkład enzymatyczny i nie są skuteczne w leczeniu zakażeń wywołanych przez szczepy wytwarzające β -laktamazy.

Inną, istotną klinicznie grupą są cefalosporyny, przede wszystkim należące do III (np. ceftriakson czy cefotaksym) i IV generacji (np. cefepim). Antybiotyki z tych grup cechuje poszerzony zakres działania oraz oporność na działanie wielu β -laktamaz (nie obejmuje to oporności na β -laktamazy o poszerzonym spektrum substratowym – ESBL (ang. Extended Spectrum Beta-Lactamases). W zakażeniach górnych dróg oddechowych powszechnie stosowane są też cefalosporyny II generacji takie, jak cefuroksym, cefaklor czy cefprozil.

Spośród pozostałych grup antybiotyków β -laktamowych, rzadziej stosowane w leczeniu zakażeń wywołanych przez *H. influenzae* są karbapenemy (np. imipenem czy meropenem) oraz monobaktamy (aztreonam).

Istotne miejsce w leczeniu zakażeń bakteryjnych zajmują preparaty penicylin z inhibitorami β -laktamaz takimi, jak kwas klawulanowy. Blokują one enzymy rozkładające antybiotyk (β -laktamazy) unieczynniając bakteryjny mechanizm oporności. W leczeniu *H. influenzae* stosowane są preparaty takie, jak amoksyacylina z kwasem klawulanowym, ampicylina z sulbaktamem lub piperacylina z tazobaktamem.

Mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych polega na oddziaływaniu z białkami wiążącymi penicy-

linę PBP (ang. Penicillin Binding Proteins), które odgrywają kluczową rolę w III etapie syntezy mureiny. Katalizują one reakcję polimeryzacji łańcucha cukrowego ściany komórkowej oraz wytwarzanie wiązań poprzecznych między aminokwasami sąsiednich łańcuchów glikopeptydu w ścianie komórkowej bakterii. Zależnie od rodzaju białka, różne jest ich powinowactwo do antybiotyków β -laktamowych.

Antybiotyki β -laktamowe, na zasadzie podobieństwa substratowego, blokują jedno lub więcej białek PBP. Prowadzi to do zahamowania syntezy ściany komórkowej i śmierci komórki bakteryjnej. Zablockowanie tylko jednego z białek PBP może prowadzić do występowania zmian w kształcie komórki; występowania komórek okrągłych, lub też komórek rosnących w postaci długich filamentów.

W komórkach *H. influenzae* funkcjonuje 8 różnych białek PBP [20]. Początkowo były one oznaczone numerami PBP1-8 [31, 38]. Później przyjęto numerację PBP1A, 1B, 2, 3A, 3B, 4, 5 i 6 [46].

Antybiotyki β -laktamowe u bakterii Gram-ujemnych pokonują barierę błony zewnętrznej poprzez kanały porynowe [28]. W komórkach *H. influenzae* rolę w ich transporcie odgrywa poryna – białko OMP-P2 [35], bardzo dobrze przepuszczająca małe cząsteczki β -laktamów. Efektem tego są bardzo niskie wartości MIC (najmniejsze stężenie hamujące, Minimal Inhibitory Concentration) antybiotyków β -laktamowych u wrażliwych szczepów tego gatunku.

W ZOMR o etiologii *H. influenzae* lekami pierwszego wyboru są cefalosporyny III generacji takie, jak cefotaksym i ceftriakson. Leki te dobrze penetrują do płynu mózgowo-rdzeniowego, są skuteczne w leczeniu, a dotychczas u pałeczek hemofilnych nie identyfikowano na nie oporności. Przez wiele lat z powodzeniem była stosowana ampicylina, jednak aktualnie liczba szczepów *H. influenzae* opornych na ten lek w niektórych krajach jest już bardzo wysoka. Chloramfenikol, ze względu na jego poważne działania uboczne, jest obecnie rzadko stosowany w krajach rozwiniętych, ale wrażliwość Hib jest na lek powszechna. Zastosowanie chloramfenikolu może być uzasadnione wyłącznie brakiem innej opcji terapeutycznej (ze względu na oporność szczepu lub poważne uczulenie pacjenta na antybiotyki β -laktamowe grożące wystąpieniem wstrząsu anafilaktycznego po ich podaniu). W krajach rozwijających się, ze względu na niską cenę, chloramfenikol jest nadal często stosowanym chemioterapeutycznym.

W innych zakażeniach o etiologii *H. influenzae*, głównie w zakażeniach układu oddechowego często stosuje się amoksyacylinę, amoksyacylinę z klawulanianem, cefalosporyny II generacji, tetracykliny, nowsze makrolidy takie, jak klarytromycynę czy azytromycynę oraz fluorochinolony.

3. Mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe

3.1. Wytwarzanie β -laktamaz

β -laktamazy TEM: *H. influenzae* wytwarza dwa rodzaje enzymów należących do rodziny TEM β -laktamaz: TEM-1 oraz TEM-2 [35, 50], różniące się nieznacznie punktem izoelektrycznym. Geny kodujące te enzymy różnią się pojedynczą substytucją cytozyny na adeninę w pozycji 4094 [50] (numeracja według sekwencji Sutcliffe transpozonu Tn3 [56]), w wyniku czego znika miejsce cięcia rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *MboI* (\downarrow GATC). Na poziomie sekwencji aminokwasowej dochodzi do zamiany glicyny w pozycji 37 (kodon CAG) na lizynę (AAG). Obydwa te enzymy mają podobny zakres działania, jednak TEM-1 wykazuje nieznacznie niższą aktywność względem niektórych antybiotyków β -laktamowych [21], co może być spowodowane różnicami w sile promotorów obu genów. Ekspresja genu kodującego enzym TEM-2 jest regulowana przez promotory Pa/Pb o wysokim powinowactwie do RNAP (polimerazy RNA) [7, 8, 64]. Oba enzymy należą, według klasyfikacji Bush, do klasy 2b i zaliczane są to tzw. β -laktamaz o szerokim spektrum substratowym (ang. broad spectrum beta-lactamases) [4].

Enzymy te są często identyfikowane u bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i bakterii blisko spokrewnionych [7]. Gen *bla*_{TEM-1} występuje na transpozonach z rodzin transpozonów Tn2 i Tn3, natomiast *bla*_{TEM-2} zlokalizowany jest w obrębie transpozonów z rodziny Tn1 [7]. Badania sekwencji nukleotydowych tych transpozonów wskazują na przeniesienie genu *bla*_{TEM-1} z rodziny *Enterobacteriaceae* do *H. influenzae* na transpozonie Tn2 [8, 30].

U *H. influenzae* częściej występującym enzymem jest TEM-1 [41, 50]. Ekspresja genu *bla*_{TEM-1} u *H. influenzae* jest regulowana, inaczej niż u większości *Enterobacteriaceae*, przez układ silnych promotorów Pa/Pb (występujących zazwyczaj z *bla*_{TEM-2}), a nie przez regulujący ten gen promotor P3 [7, 64]. Błona zewnętrzna *H. influenzae* stanowi słabszą barierę dla antybiotyków β -laktamowych niż błona bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, tak więc gen β -laktamazy ulegający ekspresji na niskim poziomie może nie warunkować wystarczającego poziomu oporności, co może mieć wpływ na selekcję szczepów niosących gen o wyższym poziomie ekspresji. W genomach niektórych szczepów zaobserwowano także delecję 136 par zasad w rejonie promotorowym tych genów [41, 64]. Efektem tej mutacji jest wyższa ich oporność na cefaklor czy lorakarbef [41].

Dotychczas nie zaobserwowano u *H. influenzae* β -laktamaz typu ESBL, tj. rozkładających cefalospo-

ryny III generacji. Część enzymów typu ESBL, takich jak TEM-3, TEM-4, TEM-5, wywodzi się od wspomnianych enzymów TEM-1 czy TEM-2. β -laktamazy typu ESBL są obserwowane głównie u *Enterobacteriaceae*. W ostatnim czasie opisano jednak kliniczne szczepy *H. parainfluenzae* wytwarzające taki enzym [65]. Prawdopodobnie enzymy kodowane przez geny znajdujące się zazwyczaj na transpozonach, zostaną przeniesione do bakterii *H. influenzae*, albo enzymy TEM-1 czy TEM-2, już występujące u bakterii, „zmutują” do ESBL [63]. Eksperymentalne przeniesienie genów kodujących enzymy typu ESBL (z *E. coli*: TEM-3, TEM-4 i TEM-5) do komórek *H. influenzae* skutkowało wzrostem poziomu oporności bakterii na cefalosporyny o poszerzonym zakresie działania, jak cefotaksym, ale oporność nie była tak wysokiego stopnia, by mogła mieć istotne znaczenie kliniczne [62, 63]. Możliwe, że niski poziom oporności, jaki nadawały enzymy typu ESBL bakteriom *H. influenzae* ogranicza ich rozprzestrzenianie. Enzymy te, jeśli występowały wraz z opornością receptorową polegającą na zmianach w białkach PBP3, nadawały komórkom wysoki poziom oporności na cefotaksym [3]. Jak dotąd takie szczepy *H. influenzae* zostały stworzone wyłącznie w warunkach laboratoryjnych. Jednakże dodatni wynik eksperymentów wskazuje na możliwość wyewoluowania podobnych szczepów ze szczepów wykazujących oporność receptorową i wytwarzających β -laktamazę TEM-1 czy TEM-2, na drodze generowania mutacji w genach kodujących β -laktamazę i poszerzających ich zakres substratowy [3]. Inną możliwością jest przeniesienie genów kodujących enzymy typu ESBL do szczepów wykazujących receptorowy mechanizm oporności na β -laktamy. Powszechne stosowanie cefalosporyny III generacji może doprowadzić do selekcji tak opornych szczepów.

β -laktamaza ROB: β -laktamaza ROB-1 została po raz pierwszy opisana u bakterii *H. influenzae*. Analiza sekwencji aminokwasowej enzymu wykazała, że jest on spokrewniony z β -laktamazami bakterii Gram-dodatnich [23]. Enzym został odnaleziony także w komórkach innego gatunku z rodzaju *Haemophilus* – *H. pleuropneumoniae*, który jest patogenem świń [37]. Możliwe więc, że gatunek *H. influenzae* jest źródłem β -laktamazy ROB-1.

W klasyfikacji Bush β -laktamaza ROB-1 należy do grupy 2b (tej samej, co wcześniej opisane enzymy TEM). W porównaniu z β -laktamazą TEM, ROB-1 cechuje wyższa aktywność wobec cefakloru, cefprozilu czy lorakarbefu [25].

Nie opisano dotychczas szczepów wytwarzających warianty β -laktamazy ROB wykazujących aktywność wobec cefalosporyny III generacji. Eksperymenty z wykorzystaniem hiperzmiennego szczepu *E. coli* wykazały jednak, iż spontaniczne mutacje w genie *bla*_{ROB-1} mogą

doprowadzić do powstania takich wariantów β -laktamazy ROB [16]. Na skutek presji antybiotykowej, szczepy wytwarzające zmutowane enzymy mogą stać się w przyszłości potencjalnym problemem klinicznym.

W przypadku *H. influenzae* wytwarzających zarówno β -laktamazy typu TEM i ROB, obserwuje się zjawisko tzw. efektu inokulum [2, 57]. Efekt ten jest określany, jako co najmniej czterokrotny wzrost wartości MIC przy zwiększeniu inokulum o jeden rząd wielkości. Nie występuje on w przypadku szczepów niewykazujących tego typu oporności mimo, iż podczas oznaczeń lekowrażliwości metodą rozcieńczeniową zmętnienie roztworu o większym inokulum, wywołane tworzeniem się agregatów martwych komórek bakteryjnych może sprawiać znaczne problemy w odczycie wyników. Efekt inokulum znieść można poprzez zastosowanie inhibitora β -laktamaz, ale w większej niż normalnie ilości (w proporcji 1:1 z antybiotykiem) [2].

Około 15% szczepów *H. influenzae* izolowanych na świecie wytwarza β -laktamazy [13]. Taki fenotyp oporności określa się skrótem BLPAR (Beta-Lactamase Positive/Producing, Ampicillin Resistant). Oporność ta jest związana z wytwarzaniem trzech różnych β -laktamaz. Najczęściej spotykanym enzymem jest β -laktamaza TEM, która jest wytwarzana w około 93% szczepów (spośród wszystkich wykazujących enzymatyczny typ oporności). Zdecydowanie rzadziej produkowana jest β -laktamaza ROB-1 (około 5%). Sporadycznie izolowane są szczepy wytwarzające β -laktamazę VAT [51]. Zazwyczaj nie spotyka się bakterii wytwarzającej więcej niż jeden typ enzymu, jednak został opisany szczep wytwarzający zarówno β -laktamazę TEM-1, jak i ROB-1 [50].

Obserwowane są istotne różnice geograficzne w występowaniu szczepów *H. influenzae* wytwarzających β -laktamazy; na Tajwanie prawie 68% szczepów wykazuje ten rodzaj oporności [13], w Ameryce Południowej częstość występowania takich szczepów jest niska, a w Peru czy Wenezueli nie identyfikowano szczepów wytwarzających β -laktamazy. Występują również duże różnice w rodzajach wytwarzanej β -laktamazy w danej populacji. β -laktamaza ROB-1, jak opisano wyżej, jest rzadko wytwarzanym enzymem. Jednak i tu obserwuje się znaczne zróżnicowanie geograficzne; w Meksyku 30% szczepów wytwarzających β -laktamazy wytwarza enzym ROB-1 [13], a w Kanadzie około 10% [50].

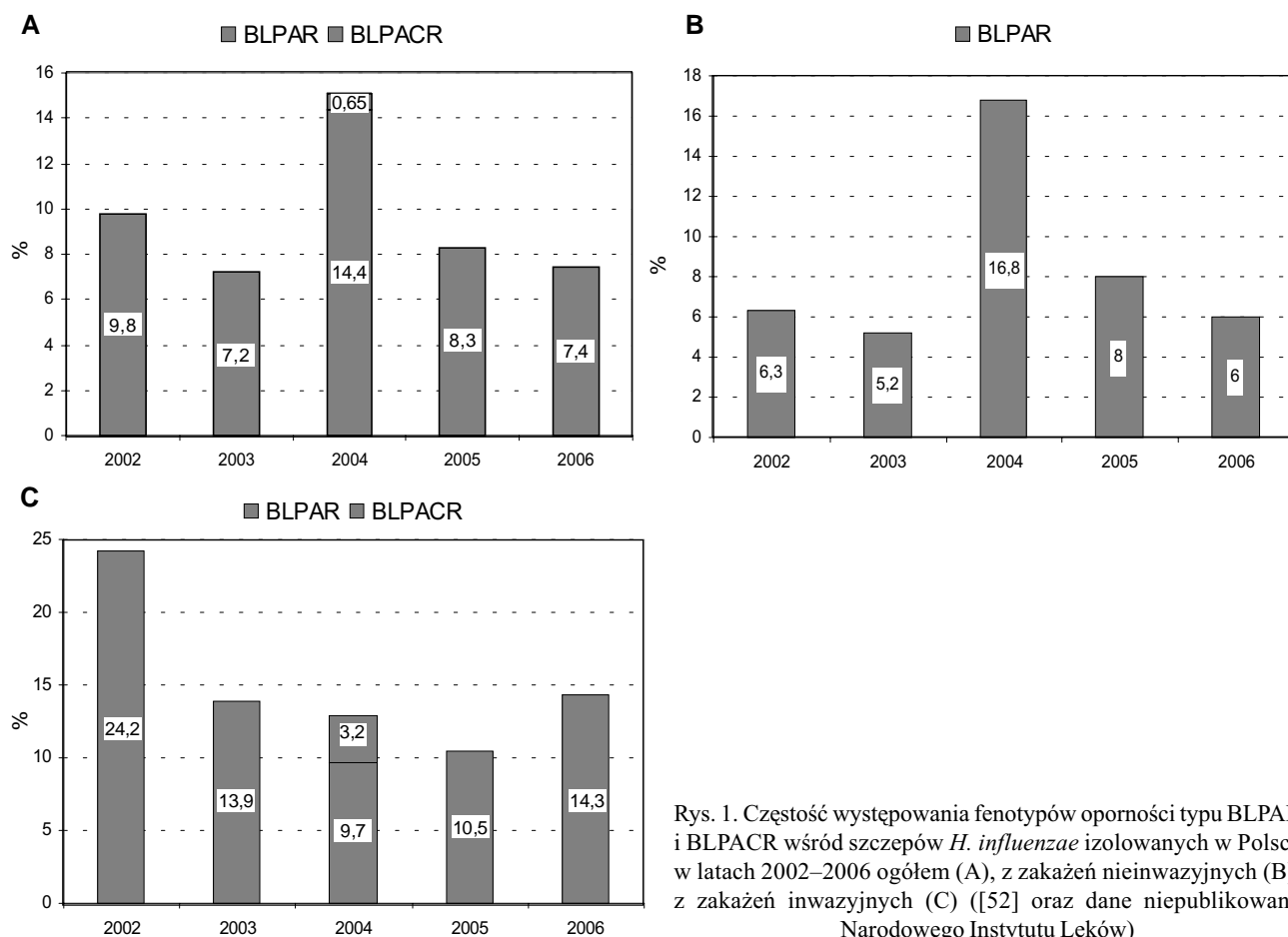
W Polsce częstość izolacji bakterii *H. influenzae* wytwarzających β -laktamazy, na przestrzeni lat 2002–2006, wahała się od 7,2 w roku 2003 do 15% w roku 2004 (Rys. 1). Spośród bakterii izolowanych z zakażeń dróg oddechowych częstość tego fenotypu oporności wahała się od 5,2% w 2003 roku do 16,8% w 2004 roku, jednakże zazwyczaj utrzymywała się na poziomie poniżej 10% [52]. Wszystkie te szczepy wytwarzały β -laktamazę TEM-1.

Laboratoryjne wykrywanie β -laktamaz: Wykrywanie β -laktamaz jest proste poprzez wykorzystanie testu z nitrocefiną. Związek ten, posiadający pierścień β -laktamowy, po jego rozerwaniu przez β -laktamazę zmienia kolor z bezbarwnego na czerwony. Aktualnie stosowane są szybkie testy w postaci krążków lub paszków bibułowanych nasączonych roztworem nitrocefiny, które w kilka sekund wykrywają obecność β -laktamazy w komórkach *H. influenzae*. Najprostszą metodą identyfikacji wytwarzanego enzymu jest reakcja PCR z użyciem starterów komplementarnych do nukleotydowych sekwencji genów kodujących TEM-1 i ROB-1. Rozróżnienie między genami kodującymi enzymy TEM-1 i TEM-2 można osiągnąć trawiąc produkty reakcji PCR enzymem restrykcyjnym *MboI*. Innym sposobem rozróżnienia dwóch rodzajów enzymów z rodziny TEM jest określenie ich punktu izoelektrycznego.

3.2. Zmiany w białkach PBP i fenotyp BLNAR

Wzmianki o szczepach opornych na ampicylinę, ale niewytwarzających β -laktamaz pojawiły się w piśmiennictwie już w 1974 roku [60]. Pierwszy oporny na ampicylinę szczep, wyizolowany w 1977 roku w USA od chorej z ZOMR, opisany został w 1980 roku [33]. Cztery lata później P a r r i B r y a n [46] oraz równolegle M e n d e l m a n i w s p. [38] zbadali mechanizm warunkujący tego rodzaju oporność. Z danych eksperymentalnych przedstawionych przez obie grupy badaczy wynikało, że oporność nie jest związana ze zmianą przepuszczalności błony zewnętrznej ani zmianami w białkach porynowych, ale ma charakter receptorowy i wynika ze zmian w powinowactwie antybiotyku do białek PBP, a zwłaszcza do PBP3A i PBP3B. Wnioski te potwierdziły późniejsze badania nad sklonowanym genem kodującym zmienione białko PBP3 [9]. Wykazano, iż mutacje w genie kodującym białko PBP3 prowadzą do zmniejszenia powinowactwa antybiotyku do tego białka. Z czasem szczepy wykazujące ten typ oporności zaczęto nazywać BLNAR (Beta-Lactamase Negative/Nonproducing Ampicillin Resistant). Badania nad pochodzeniem bakterii o fenotypie BLNAR wykazały, że nie pochodzą one z jednego klonu, w którym białko PBP3 uległy mutacji, lecz wykazują duże zróżnicowanie i raczej wywodzą się z różnych szczepów [11, 39].

To zróżnicowanie podkreślili C l a i r o u x i w s p. [9], którzy podczas badania kanadyjskich szczepów o fenotypie BLNAR, wyróżnili trzy grupy, przyjmując jako kryterium podziału poziom oporności na ampicylinę. Wartości MIC ampicyliny w poszczególnych grupach wynosiły odpowiednio: grupa I: 0,5–1,0 $\mu\text{g/ml}$; grupa II: 2,0–4,0 $\mu\text{g/ml}$; grupa III: 8,0 $\mu\text{g/ml}$. Wszystkie szczepy wykazywały oporność związaną wyłącznie ze zmianami w sekwencjach aminokwasowych białek PBP3A i 3B.



Rys. 1. Częstość występowania fenotypów oporności typu BLPAR i BLPACR wśród szczepów *H. influenzae* izolowanych w Polsce w latach 2002–2006 ogółem (A), z zakażeń nieinwazyjnych (B), z zakażeń inwazyjnych (C) ([52] oraz dane niepublikowane Narodowego Instytutu Leków)

W 2001 roku Ubukata i wsp. [66] zbadali genetyczne podłoże zmian w białkach PBP3 i PBP4, których efektem jest powstawanie szczepów o fenotypie BLNAR. Opisali oni kilka substytucji w sekwencji nukleotydowej genu *ftsI*. Gen ten koduje białka PBP3A oraz PBP3B, które, jak się podejrzewa, są syntetyzowane z wykorzystaniem tej samej informacji genetycznej, ale ulegają innym modyfikacjom posttranslacyjnym [32, 66]. Skutkiem mutacji w genie *ftsI* są pojedyncze zmiany w sekwencjach aminokwasowych występujące w pobliżu ważnych motywów białek. Analiza mutacji zaowocowała, podobnie jak we wcześniej opisanym podziale zaproponowanym przez Claïroux, wyróżnieniem przez Ubukatę trzech grup bakterii o fenotypie BLNAR.

Grupa I obejmuje szczepy posiadające w PBP3 argininę w pozycji 517 zamienioną na histydynę. W PBP3 szczepów zaliczanych do grupy II lizyna znajduje się w pozycji 526 – w miejscu normalnie występującej tam asparaginy. Obie mutacje, zarówno w grupie I, jak i II, występują w pobliżu konserwowanego motywu KTG (Lys512-Thr513-Gly514). Klasyfikację grupy II rozszerzyli później Dabernat i wsp. [11], wyszczególniając cztery podgrupy: a, b, c, d. Wszystkie one posiadają charakterystyczną dla grupy II substytucję lizyny-526 w miejsce asparaginy (taka pojedyncza

mutacja zaliczona została do podgrupy IIa), lecz oprócz tego posiadają one kilka różnych dodatkowych zmian w sekwencjach aminokwasowych takich, jak zamiana alaniny w pozycji 502 na walinę, charakterystyczną dla podgrupy IIb, lub na treoninę występującą w podgrupie IIc. Podgrupę II d charakteryzuje natomiast zamiana w PBP3 izoleucyny-449 na walinę. Bakterie z tych grup zaliczane są do fenotypu low-BLNAR, cdla których MIC ampicyliny zawiera się w zakresie od 1,0 do 4,0 $\mu\text{g/ml}$. Podobnie podwyższone są u nich wartości MIC innych pochodnych penicylin takich, jak amoksyicylina oraz dla cefalosporyn niższych generacji (I i II). Podwyższone są też wartości MIC cefalosporyn III generacji, jednak pozostają nadal niskie i mieszczą się w zakresie pełnej wrażliwości [11, 64].

Do grupy III zaliczane są szczepy BLNAR. MIC ampicyliny tych szczepów jest wyższy lub równy 4 $\mu\text{g/ml}$. Białko PBP3 tych szczepów charakteryzuje zamiana asparaginy-526 na lizynę (tak samo jak ma to miejsce w grupie II), a dodatkowo posiadają trzy substytucje w okolicach innego ważnego motywu SSN (Ser379-Ser380-Asn381). Zmutowanie genu skutkuje zamianą metioniny-377 na izoleucynę, seryny-385 na treoninę oraz leucyny-389 na fenyloalaninę w białku PBP3. Oprócz tych zmian, białko PBP3 wszystkich trzech grup bakterii o fenotypie BLNAR, charakteryzuje

dotatkowo zamiana asparaginanu-350 na asparaginę oraz seryny-357 na asparaginę. Aminokwasy te znajdują się w sąsiedztwie motywu STVK (Ser327 – Thr328 – Val329 – Lys330).

Kolejne badania dowolnie rozszerzały klasyfikację szczepów typu BLNAR, a różni autorzy, znajdując kolejne mutacje lub inne kombinacje mutacji już znanych, często tworzyli własne klasyfikacje inaczej grupujące odporne szczepy *H. influenzae* [19, 45].

Szczepy BLNAR z grupy III wykazują wyraźnie podwyższone wartości MIC cefalosporyn III generacji takich, jak cefotaksym (wartość MIC około 1,0–2,0 µg/ml) oraz ceftriakson (MIC około 0,25 µg/ml) [34, 66]. Także cefalosporyny IV generacji, takie jak cefpirom, mogą wykazywać wobec takich szczepów niższą aktywność *in vitro* [29]. Wydaje się, że za obniżoną wrażliwość bakterii grupy III na antybiotyki β-laktamowe odpowiada w głównej mierze mutacja skutkująca substytucją fenyloalaniny-389 w miejsce leucyny w PBP3 [34]. Inni badacze wskazują na istotną rolę w nadawaniu oporności na np. cefuroksym zmiany seryny w pozycji 357 na asparaginę [54]. Występowanie wielu dodatkowych mutacji punktowych w badanych genach może pogłębiać oporność na cefalosporyny, także te III i IV generacji [29].

Wszystkie omawiane motywy aminokwasowe (KTG, SSN czy STVK) występują w centrum aktywnym białek PBP3 a dokładniej w jego domenie transpeptydazy [66]. Dlatego też zmiany w ich pobliżu mogą istotnie wpływać na przestrzenną strukturę centrum aktywnego. Zmiana konformacji białka może nie być dla komórki letalna, jeśli białko nadal ma zdolność katalizowania reakcji enzymatycznej, ale może utrudniać wiązanie się „zmutowanych” białek z antybiotykami β-laktamowymi. Obserwowane zmiany w PBP3 nie pozostają jednak całkiem obojętne dla komórki, gdyż bakterie wytwarzające zmutowane białka PBP3 mają charakterystyczny wydłużony kształt, a mogą nawet tworzyć długie filamenty [9]. Analizując strukturę białka PBP3, poprzez jego porównanie z białkiem PBP2X *Streptococcus pneumoniae* [55] wykazano, że powyższe zmiany w sekwencjach aminokwasowych wpływają na zmianę struktury miejsca wiążącego antybiotyki β-laktamowe powodując, iż staje się ono dla nich niedostępne.

Rzeczywisty wpływ wykrytych mutacji w genach kodujących białko PBP3 na stopień oporności *H. influenzae* przebadał zespół O s a k i i wsp. [45] używając metody mutagenyzy specyficznej co do miejsca. Badacze ci wprowadzali do szczepów z dzikim genem *ftsI* takie mutacje punktowe, jakie obserwowane były najczęściej w genach kodujących zmienione białka. W efekcie, potwierdzona została rola większości powstających mutacji. Substytucja Asn526→Lys czy Asn526→Lys + Ser385→Thr podnosiła MIC ampicyliny 2–4 razy. Sama mutacja warunkująca zmianę Asn526→Lys pod-

nosiła MIC cefalosporyn 2–8 razy. Dodatkowe zmiany Ser385→Thr czy Leu389→Phe jeszcze zwiększały poziom oporności. Mutacja powodująca substytucję Asn526→Lys również znacząco (8 razy) zwiększała oporność bakterii na imipenem, lecz nie na meropenem. Co istotne, wykazano iż zamiana metioniny w pozycji 377 na izoleucynę nie wpływa w żadnym stopniu na oporność bakterii na antybiotyki β-laktamowe.

Ze względu na znaczne zróżnicowanie klonalne szczepów o fenotypie BLNAR [17], wielość znajdujących miejsc mutacji oraz różne ich wzajemne występowanie w genie *ftsI*, trudno jest określić kierunki ewolucyjne tych zmian. Takie badania śledzące zmiany w występowaniu mutacji w białkach PBP3 w szczepach *H. influenzae* izolowanych w Japonii na przestrzeni 9 lat przeprowadzili S a n b o n g i i wsp. [48]. Wskazują oni na wyraźny wzrost częstości występowania mutacji warunkującej powstawanie Asn526→Lys. Wzrasta także częstość występowania tej mutacji w połączeniu z mutacjami powodującymi zmiany Met377→Ile, Ser385→Thr oraz Leu389→Phe. Jednocześnie spada częstość występowania substytucji Arg517→His. Te tendencje mogą mieć jednak charakter lokalny i być związane ze specyfiką leczenia, a zwłaszcza z dobozem poszczególnych antybiotyków i wielkości ich dawek stosowanych w danym kraju.

Pojawienie się szczepów opornych na antybiotyki β-laktamowe na drodze innej niż enzymatyczna mogło spowodować wyewoluowanie szczepów posiadających oba te mechanizmy. Szczepy takie po raz pierwszy zostały wyizolowane w USA na przełomie 1994 i 1995 roku [12]. Opisano od razu aż siedemnaście izolatów klinicznych charakteryzujących się prawdopodobnie obecnością mutacji w białkach PBP, jak i wytwarzanie β-laktamazy odpornej na inhibicję kwasem klawulanowym lub inne możliwe mechanizmy oporności. Późniejsze badania wykazały, że szczepy o tym fenotypie wykazują te same rodzaje mutacji w genie *ftsI*, co szczepy BLNAR [34]. Nie wykryto natomiast występowania β-laktamazy odpornej na inhibicję kwasem klawulanowym. W piśmiennictwie zwykło się je określać skrótem BLPACR (Beta-Lactamase Positive/Producing, Amoxicillin-Clavulanate Resistant) [12].

Ze względu na wspomnianą wyżej różnorodność zarówno szczepów o fenotypie BLNAR, jak i BLPACR, trudno określić wzajemne korelacje tych fenotypów. Badania podobieństwa materiału genetycznego bakterii (prowadzone metodami takimi, jak RAPD czy RFLP-PFGE), wykonywane lokalnie wykazują, iż niektóre szczepy o fenotypie BLPACR mogą być dość blisko spokrewnione z równoległymi występującymi na danym obszarze szczepami o fenotypie BLNAR [19]. Wskazuje to na powstawanie szczepów o fenotypie BLPACR poprzez nabywanie przez szczepy ze zmienionymi białkami PBP plazmidowo kodowanych β-laktamaz.

Powstawanie szczepów *H. influenzae* o fenotypie BLNAR nie musi zachodzić wyłącznie na drodze generowania mutacji spontanicznych i rozprzestrzeniania się wyłącznie klonalnie. Bakterie te mają bowiem zdolność do tzw. międzykomórkowego transferu genów chromosomalnych z wykorzystaniem mechanizmu odmiennego od transformacji czy koniugacji [1]. Mogą one pobierać ze środowiska DNA zawierający specyficzną dla rodzaju *Haemophilus* sekwencję USS (Uptake Signal Sequence). Taki fragment DNA jest następnie wbudowywany w genom bakterii na drodze rekombinacji homologicznej. W genie *ftsI* sekwencja USS występuje w dwóch miejscach. Możliwa jest więc rekombinacja fragmentu genu *ftsI*. Jak dowodzą Takahata i wsp. [58], możliwe jest przekazywanie zmienionej wersji genu *ftsI* podczas współwystępowania w jednej niszy ekologicznej szczepów BLNAR i BLNAS (Beta-Lactamase Negative/Non-producing, Ampicillin Susceptible). Autorzy ci wykazali również możliwość horyzontalnego transferu genu *ftsI* między różnymi gatunkami bakterii z rodzaju *Haemophilus*. Fakt ten powoduje, iż inne gatunki tego rodzaju (takie jak *H. haemolyticus*) mogą stanowić rezerwuar zmutowanej wersji genu *ftsI* leżącej u podstaw fenotypu BLNAR.

Występowanie bakterii wykazujących oporność receptorową może nieść za sobą poważne problemy w leczeniu zakażeń wywoływanych przez *H. influenzae*. Co prawda, w wielu przypadkach poziom oporności szczepów pozostaje stosunkowo niski, jednak powstające zmiany otwierają drogę do zwiększania się oporności w przyszłości (za Hernandezem, [11]). Jak dotąd oporność na często stosowane w leczeniu cefalosporyny III generacji nie stanowi problemu i leki tej grupy pozostają aktywne także wobec szczepów o fenotypie BLNAR. Zauważalna jest jednak selekcja mutacji w białkach PBP, prowadząca do zwiększania się wartości MIC tych antybiotyków [29, 48]. W związku z tym niektórzy badacze postulują stosowanie antybiotyków β -laktamowych z innymi grupami, które blokują inne białka PBP i działają także na szczepy BLNAR. Takimi antybiotykami są karbapenemy a zwłaszcza meropenem, jako lek o większej aktywności od imipenemu i zachowujący wysoką aktywność także wobec szczepów o fenotypie BLNAR [22, 40].

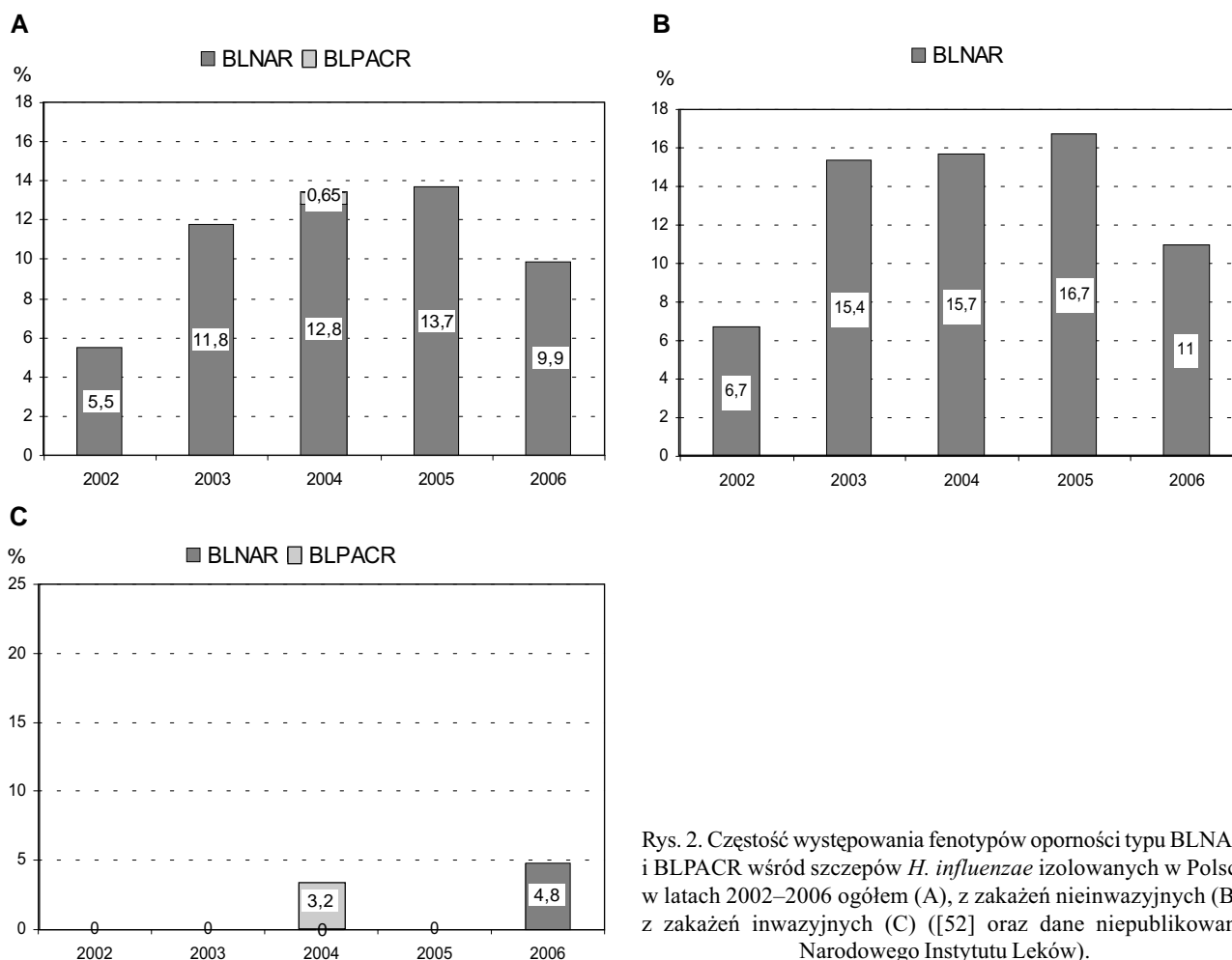
Karbapenemy działają przede wszystkim na białka PBP4 i PBP5. Opisano szczepy *H. influenzae* wykazujące obniżoną wrażliwość na karbapenemy na drodze zmniejszenia powinowactwa antybiotyku do białka PBP4 [36]. Zsekwencjonowanie przez Ubukate i wsp. [66] genu *dacB* kodującego białko PBP4, wykazało u niektórych szczepów delecję 7 nukleotydów w pozycji 943–949, co powodowało zmianę ramki odczytu i wcześniejszą terminację translacji. Łańcuch kończył się w odległości zaledwie 20 aminokwasów za motywem SDN, a motyw KTG w ogóle w nim

nie występował. Mutacja nie powodowała jednak spadku wrażliwości na karbapenemy, ani inne badane antybiotyki [66].

Innym antybiotykiem wykazującym *in vitro* aktywność wobec szczepów *H. influenzae* typu BLNAR jest piperacylina [42]. W oznaczeniach laboratoryjnych działa ona na szczepy BLNAR często skuteczniej niż cefalosporyny III generacji i, w przeciwieństwie do nich, dodatkowo indukuje procesy autolizy bakterii. Wysoka aktywność wobec szczepów o fenotypie BLNAR może wynikać z faktu, że lek ten blokuje nie tylko białka PBP3, ale również białko PBP2 [42]. Piperacylina nie wykazuje jednak tak wysokiej aktywności wobec szczepów o fenotypie BLPACR, gdyż jest wrażliwa na działanie β -laktamaz [29]. W tym wypadku aktywność piperacyliny zostaje zachowana poprzez skojarzenie jej z inhibitorem β -laktamaz – tazobaktamem [48]. Wskazanie do stosowania piperacyliny wobec szczepów o fenotypie BLNAR jest jednak niejednoznaczne, gdyż według wytycznych CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) szczepy te należy traktować jako odporne na ten antybiotyk mimo możliwej aktywności *in vitro* [10].

Częstość występowania szczepów *H. influenzae* o fenotypie BLNAR wykazuje duże zróżnicowanie pod względem geograficznym: w USA szczepy o tym fenotypie stanowią poniżej 1% wszystkich izolowanych pałeczek hemofilnych a w latach 2000–2001 wykryto tam tylko 9 przypadków (0,6%) zakażeń wywołanych przez szczepy BLNAR. Zidentyfikowano je w dwóch ośrodkach a szczepy bakteryjne okazały się dodatkowo przedstawicielami tego samego klonu, co dowodziło istnienia klonalnego rozprzestrzeniania się oporności typu badawczego. Zupełnie odmienna sytuacja ma miejsce w Japonii, gdzie w 1998 roku aż 28% izolowanych *H. influenzae* stanowiły bakterie o fenotypie BLNAR [66]. W przypadku zakażeń inwazyjnych o etiologii *H. influenzae* (takich jak ZOMR), częstość występowania szczepów BLNAR wzrosła w Japonii z 34% w 1999 do 67,3% w 2002 roku (wliczając w to także fenotypy low-BLNAR oraz BLPACR) [19]. Haselga i wsp. [19] zwracają uwagę, iż taka różnica w częstości występowania szczepów BLNAR między Japonią a USA może wynikać z faktu stosowania innych dawek antybiotyków w obu krajach. W Japonii dawki ampicyliny czy amoksyliny z kwasem klawulanowym są około dwa do trzech razy niższe niż w USA, co może prowadzić do łatwiejszego „powstawania” szczepów opornych.

W Europie również istnieją duże różnice w częstości występowania fenotypu BLNAR u klinicznych izolatów *H. influenzae*. Jak donoszą Fluit i wsp. [14], wśród szczepów izolowanych z zakażeń układu oddechowego, średnia częstość występowania szczepów fenotypu BLNAR wynosiła 8,8% w latach 1997–1998 i wzrosła do 9,6% w latach 2002–2003. W tych latach



Rys. 2. Częstość występowania fenotypów oporności typu BLNAR i BLPACR wśród szczepów *H. influenzae* izolowanych w Polsce w latach 2002–2006 ogółem (A), z zakażeń nieinwazyjnych (B), z zakażeń inwazyjnych (C) ([52] oraz dane niepublikowane Narodowego Instytutu Leków).

najniższą częstość występowania szczepów BLNAR odnotowano w Niemczech – 2% izolowanych szczepów, oraz we Włoszech – 3,3%. Inną sytuację zaobserwowano w Hiszpanii, Portugalii, Irlandii oraz Wielkiej Brytanii, gdzie procent szczepów o fenotypie BLNAR wynosił odpowiednio: 11,1%, 11,8%, 15,2% oraz 18,2% [14].

Według badań Fluita i wsp. [14], najwyższą częstość występowania bakterii o fenotypie BLNAR w Europie zaobserwowano w Polsce. Wynosiła ona 20% w latach 2002–2003. Dane te jednak obarczone są dużym błędem statystycznym, gdyż zostały przeprowadzone na niewielkiej liczbie szczepów (35 izolatów z Polski). Dokładniejsze informacje dotyczące częstości występowania fenotypu BLNAR w Polsce uzyskano w ramach prowadzonego przez Narodowy Instytut Leków „Wieloośrodkowego badania wrażliwości na leki bakterii wywołujących zakażenia dróg oddechowych w środowisku pozaszpitalnym w Polsce” (kontynuacja projektu Alexander). Wyniki badań wykazały, że wartości podane przez Fluita i wsp. [14] były wyższe od stanu faktycznego, gdyż szczepy BLNAR w 2002 roku stanowiły 6,7%, natomiast w 2003 roku – 15,4% wszystkich szczepów pałeczek

hemofilnych izolowanych z zakażeń układu oddechowego (Rys. 2). Spośród wszystkich izolatów klinicznych *H. influenzae* w Polsce odsetek był nieznacznie niższy i wynosił w tych latach odpowiednio 5,5% i 11,8%. Wśród szczepów serotypu b ten mechanizm oporności nadal pozostaje bardzo rzadki. Jak dotąd, wyizolowane zostały w Polsce tylko dwa takie szczepy – po jednym w latach 2004 i 2006. Niepokojący jest jednak fakt, iż częstość występowania bakterii o fenotypie BLNAR w Polsce wśród populacji *H. influenzae* w ciągu ostatnich lat sukcesywnie zwiększa się (nieвелиki spadek zaobserwowano w 2006 roku). Wszystkie takie szczepy wykazują wartości MIC ampicyliny na poziomie 1,0–2,0 µg/ml, co kwalifikuje je do grupy bardziej wrażliwych, o fenotypie low-BLNAR. Istnieje jednak obawa, że podobnie jak wcześniej w Japonii, stopień wrażliwości tych bakterii na antybiotyki β-laktamowe może ulec dalszemu obniżeniu w wyniku powstawania dodatkowych mutacji w genie kodującym białka PBP3.

Wykrywanie fenotypu BLNAR. Duża liczba możliwych mutacji nadających różny stopień oporności na wiele antybiotyków sprawia, iż szybkie wykrywanie tego mechanizmu oporności jest problematyczne. Na-

leży jednak zwrócić uwagę, iż stopień wykrywalności szczepów BLNAR stale się poprawia [53]. Najprostszą metodą wykrycia tego fenotypu jest porównanie wartości MIC ampicyliny i amoksyliny z klawulanianem. Otrzymywane wyniki nie zawsze jednak dają jednoznaczną odpowiedź. Interpretacja wyników jest trudna zwłaszcza dla szczepów wykazujących niski stopień oporności (low-BLNAR). Łatwiejszych do interpretacji wyników dostarcza stosowanie amoksyliny zamiast ampicyliny. W przypadku metody dyfuzyjno-krażkowej bardziej wiarygodne dane eksperymentalne uzyskiwane są przy zastosowaniu krążków z 2,0 μ g ampicyliny, niż przy standardowo używanych krążkach zawierających 10,0 μ g antybiotyku [67]. Opracowywane są nowe metody szybkiego wykrywania tego mechanizmu oporności, tak ważnego w diagnostyce zakażeń.

Skuteczną i szybką metodą wydaje się zastosowanie reakcji PCR ze starterami homologicznymi do dzikiej wersji genu *ftsI*, natomiast niewykrywającymi jego zmutowanej wersji. Problemem jest jednak dobranie starterów spełniających te warunki ze względu na dużą liczbę możliwych mutacji w różnych fragmentach genu. Sprawia to, iż nie da się zaprojektować jednej pary starterów wykrywających wszystkie genotypy BLNAR w jednej reakcji. Strategią pozwalającą na częściowe rozwiązanie problemu jest stosowanie zestawu starterów diagnostycznych wykrywających najczęściej na danym rejonie występujące genotypy BLNAR. W Polsce takie badania dotychczas nie były prowadzone.

Praktycznie jedyną pewną i jednoznaczną metodą wykrywania genotypu BLNAR jest sekwencjonowanie genu *ftsI*. Ta metoda nie jest jednak szeroko dostępna i rutynowo na dzień dzisiejszy niemożliwa.

3.3. Inne mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe

Wytwarzanie β -laktamaz oraz zmiany w białkach PBP są głównymi mechanizmami warunkującymi oporność *H. influenzae* na antybiotyki β -laktamowe. Możliwe są jednak inne mechanizmy, a wiele z nich jest spotykanych u innych gatunków bakterii, co sugeruje, iż mogą one występować także w szczepach *H. influenzae*. Można wyróżnić zmniejszenie przepuszczalności błony zewnętrznej (jak ma to miejsce u *P. aeruginosa*), czy wytwarzanie nowego białka PBP, spełniającego rolę białka zablokowanego przez lek, ale posiadającego zmniejszone powinowactwo do antybiotyku (tak jak w komórkach meticylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* – MRSA, Methicillin Resistant *S. aureus*).

Innym mechanizmem oporności wykorzystywanym przez bakterie jest aktywne wypompowywanie leku z komórki warunkowane aktywnością tzw. pomp opor-

ności wielolekowej określane skrótem MDR (Multidrug resistance pumps). W komórkach *H. influenzae* opisano taki kompleks białkowy – pompę, należącą do rodziny RND (ang. Resistance-Nondulation-Cell Division). Do tej rodziny zaliczane są systemy, jak AcrAB/TolC występujące w komórkach *E. coli* czy MexAB u *P. aeruginosa*. Wszystkie wymienione wyżej pompy składają się z trzech białek. W przypadku systemu AcrAB/TolC (zarówno u *E. coli*, jak i u *H. influenzae*), białko AcrB tworzy kanał przechodzący przez błonę komórkową oraz przestrzeń peryplazmatyczną. Łączy się ono z białkiem tworzącym por w błonie zewnętrznej – TolC [61]. Całość systemu zabezpiecza i stabilizuje białko AcrA należące do rodziny peryplazmatycznych białek fuzji błon (ang. Membrane Fusion Proteins, MFP). System AcrAB/TolC ma zdolność do usuwania z komórki substancji toksycznych dla bakterii jak akryflawina, sole żółci, erytromycyna, chloramfenikol, fluorochinolony, mitomycyna a także β -laktamy. W komórkach *H. influenzae* pompa ta nie usuwa ani chloramfenikolu, ani fluorochinolonów [49, 61].

Ze względu na niską wydajność pompy AcrAB/TolC oraz wysoką przepuszczalność błony zewnętrznej *H. influenzae* dla antybiotyków β -laktamowych, spowodowana obecność opisanej wcześniej dużej poriny P2, mechanizm ten długo nie był brany pod uwagę jako istotnie wpływający na oporność na tę grupę antybiotyków [49]. Jednakże w 2004 roku, K a c z m a r e k i wsp. [24], badając oporności szczepów BLNAR ze znacznie podwyższonymi wartościami MIC ampicyliny zauważyli, iż mechanizm usuwania leku może, obok zmian w białkach PBP3, istotnie wpływać na stopień oporności badanych bakterii. Sekwencjonowanie genów wchodzących w skład kompleksu genów *acrAB* wykazało występowanie dwu insercji w genie represora AcrR – wstawienie tyminy po 40 nukleotydzie albo adeniny po 150 nukleotydzie. Obie mutacje powodowały przesunięcie ramki odczytu oraz wcześniejszą terminację translacji. Wynikająca ze zmian w sekwencji nukleotydowej genu derepresja operonu *acrAB* i nadekspresja genów wchodzących w jego skład dawała w efekcie istotny wzrost liczby pomp systemu AcrAB, a więc i znaczący wzrost ich wydajności.

4. Wielolekooporność

Duże zagrożenie w leczeniu zakażeń bakteryjnych stanowią szczepy odporne na wiele grup antybiotyków. Coraz częściej pojawiają się doniesienia o przypadkach braku opcji terapeutycznej w groźnych zakażeniach bakteryjnych, często zagrażających życiu pacjenta. Znane są też przypadki, gdy skuteczne w leczeniu pozostają wyłącznie leki wykazujące dużą toksyczność dla organizmu człowieka.

Oporność wieloraka jest definiowana jako oporność danego szczepu na co najmniej trzy grupy antybiotyków. Rozprzestrzenianie oporności na wiele leków ułatwia fakt, iż presja jednym antybiotykiem może się przyczyniać do zwiększania się ilości bakterii opornych na inne grupy antybiotyków co jest powodowane zwykle występowaniem kodujących oporność genów w obrębie tych samych mobilnych elementów genetycznych – plazmidów czy transpozonów.

W przypadku *H. influenzae* pierwsze opisane izolaty bakterii opornych zarówno na ampicylinę jak i chloramfenikol pochodzą z 1980 roku i dotyczą szczepów w większości izolowanych z zakażeń inwazyjnych. Szczepy wykazujące wieloraką oporność szybko rozpowszechniły się w Hiszpanii, gdzie w badaniu z lat 1981–83, 40,9% szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych wykazywało oporność na ampicylinę, chloramfenikol, tetracyklinę i ko-trimoksazol [5]. Jednocześnie oporność na te cztery grupy chemioterapeutyków jest wśród fenotypów oporności wielorakiej nadal najczęściej obserwowanym fenotypem u *H. influenzae*. Na Kubie, gdzie szczepy wielolekooporne stanowią 43,8% bakterii izolowanych z krwi oraz płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR), powyższy fenotyp charakteryzował 67% szczepów wielolekoopornych [59]. Najczęściej fenotyp oporności wielorakiej jest obserwowany u *H. influenzae* typu b, izolowanych z krwi lub PMR [6, 59].

Geny warunkujące oporność u szczepów z wieloraką opornością na antybiotyki, są zazwyczaj zlokalizowane na wspólnym plazmidzie, co ułatwia ich jednoczesne rozprzestrzenianie. Jednak u badanych szczepów *H. influenzae*, oporność na trimetoprim kodowana była przez gen chromosomalny [59]. Fakt ten świadczy o klonalnym szerzeniu się oporności wielorakiej [15].

W Polsce szczepy *H. influenzae* wykazujące wieloraką oporność na antybiotyki izolowane są bardzo rzadko (niepublikowane dane Narodowego Instytutu Leków).

5. Podsumowanie

Bakteryjne zakażenia układu oddechowego, wywoływane przez *H. influenzae*, *S. pneumoniae* i inne gatunki bakteryjne są przyczyną znacznej liczby zgonów na świecie. Szczepionki dostępne przeciwko niektórym z patogenów bakteryjnych, takie jak szczepionka przeciwko Hib, czy szczepionki przeciw pneumokokowe, wpływają na spadek liczby groźnych zakażeń. W przypadku pałeczek hemofilnych poważnym problemem pozostają zakażenia wywoływane przez szczepy bezotoczkowe, przeciwko którym nie opracowano dotychczas skutecznej szczepionki.

W walce z poważnymi zakażeniami wywołanymi przez *H. influenzae* istotne jest stosowanie skutecznej

terapii antybiotykowej. Epidemiologia lekooporności pałeczek hemofilnych jest jednak bardzo dynamiczna. Odkąd w latach 70. ubiegłego wieku pierwszy raz wyizolowano od chorych szczepy oporne na stosowane w leczeniu antybiotyki, problem ten narasta. Izolowane są szczepy wykazujące coraz skuteczniejsze i trudne do wykrycia mechanizmy oporności na różne, także nowsze antybiotyki.

Poznanie i zrozumienie mechanizmów oporności występujących u bakterii i stosowanie leczenia skutecznie omijającego ich działanie jest niezwykle ważne. Wiedza taka pozwala stosować antybiotyki w racjonalny sposób, ograniczający narastanie i powstawanie nowych mechanizmów oporności. Istotnym problemem jest też badanie procesów patogenezy oraz fizjologii bakterii zasiedlających ludzki organizm. Przykładem jest tu odkrycie wytwarzania biofilmów przez bakterie, także *H. influenzae*, których obecność nadaje, w nieznanym dotąd sposób, wysoki poziom oporności na antybiotyki bakteriom wrażliwym. Można więc tę strukturę uznać za kolejny ważny mechanizm oporności. Od kilku lat prowadzi się badania preparatów blokujących wytwarzanie biofilmów, które mogłyby w przyszłości być stosowane w leczeniu zakażeń.

Ciągłe monitorowanie lekowrażliwości drobnoustrojów chorobotwórczych dostarcza wiedzy o molekularnych mechanizmach warunkujących oporność, przez co może pomóc w opracowaniu szybkich metod do ich wykrywania. Ma to istotne znaczenie w szybkim i dokładnym oznaczeniu wrażliwości bakterii na antybiotyki, co umożliwi wdrożenie skutecznej terapii celowanej. Ze względu na częste problemy z szybkim określeniem wrażliwości drobnoustroju, czy też nie wykonywanie takich badań, niezmiernie ważne jest stosowanie skutecznej terapii empirycznej. Dotyczy to zwłaszcza sytuacji, w których stan pacjenta wymaga natychmiastowego włączenia skutecznego leczenia. Ze względu na powszechnie narastającą oporność na antybiotyki, bardzo istotne jest stałe śledzenie epidemiologii lekooporności drobnoustrojów oraz badanie mechanizmów leżących u jej podstaw.

Piśmiennictwo

- Albritton W.L., Setlow J.K., Slaney L.: Transfer of *Haemophilus influenzae* chromosomal genes by cell-to-cell contact. *J. Bacteriol.* **152**, 1066–1070 (1982)
- Balko T., Karlowsky J.A., Palatnick L.P., Zhanel G.G., Hoban D.J.: Characterization of the inoculum effect with *Haemophilus influenzae* and β -lactams. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 47–58 (1999)
- Bozdogan B., Tristram S., Appelbaum P.C.: Combination of altered PBPs and expression of cloned extended-spectrum β -lactamases confers cefotaxime resistance in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 747–749 (2006)

4. Bush K.: Classification of β -lactamases: Groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 264–270 (1989)
5. Campos J., Garcia-Tornel S., Sanfeliu I.: Susceptibility studies of multiply resistant *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric patients and contacts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**, 706–709 (1984)
6. Campos J., Hernando M., Roman F., Perez-Vazquez M., Aracil B., Oteo J., Lazaro E., de Abajo F., the Group of Invasive *Haemophilus* Infections of the Autonomous Community of Madrid, Spain: Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 524–529 (2004)
7. Chen S-T., Clowes R.C.: Variations between the nucleotide sequences of Tn1, Tn2, and Tn3 and expression of β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 913–916 (1987)
8. Chen S-T., Clowes R.C.: Nucleotide sequence comparisons of plasmids pHD131, pJB1, pFA3, ald pFA7 and β -lactamase expression in *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **169**, 3124–3130 (1987)
9. Clairoux N., Picard M., Brochu A., Rousseau N., Gourde P., Beauchamp D., Parr T.R., JR., Bergeron M.G., Malouin F.: Molecular basis of the non- β -lactamase-mediated resistance to β -lactam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1504–1513 (1992)
10. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational Supplement. Document M100-S17. Wayne, PA: CLSI (2007)
11. Dabernat H., Delmas C., Seguy M., Pelissier R., Faucon G., Bennamani S., Pasquier Ch.: Diversity of β -lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2208–2218 (2002)
12. Doern G.V., Brueggemann A.B., Pierce G., Holley H.P., JR., Rauch A.: Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of β -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multi-center surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 292–297 (1997)
13. Farrell D.J., Morrissey I., Bakker S., Buckridge S., Felmingham D.: Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 773–776 (2005)
14. Fluit A.C., Florijn A., Verhoef J., Milatovic D.: Susceptibility of European β -lactamase-positive and -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 133–138 (2005)
15. Fuste M.C., Pineda M.A., Palomar J., Vinas M., Loren J.G.: Clonality of multidrug-resistant nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 760–765 (1996)
16. Galan J-C., Morosini M-J., Baquero M-R., Reig M., Baquero F.: *Haemophilus influenzae* bla_{ROB-1} mutations in hypermutagenic ampC *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and β -lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaklor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2551–2557 (2003)
17. Gazagne L., Delmas C., Bingen E., Dabernat H.: Molecular epidemiology of ampicillin-resistant non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 3629–3635 (1998)
18. Gratten M.: *Haemophilus influenzae* biotype VII. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 1015–1016 (1983)
19. Hasegawa K., Chiba N., Kobayashi R., Murayama S.Y., Iwata S., Sunakawa K., Ubukata K.: Rapidly increasing prevalence of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1509–1514 (2004)
20. Hryniewicz W., Meszaros J. Red.: Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń, Wyd. Lekarskie PZWL, 2002
21. Jacoby G.A., Sutton L.: β -lactamases and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 703–705 (1985)
22. Jorgensen J.H., Maher L.A., Howell A.W.: Activity of a new carbapenem antibiotic, meropenem, against *Haemophilus influenzae* strains with β -lactamase- and non-enzyme-mediated resistance to ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 600–602 (1991)
23. Juteau J-M., Levesque R.C.: Sequence analysis and evolutionary perspectives of ROB-1 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1354–1359 (1990)
24. Kaczmarek F. S., Gootz T. D., Dib-Hajj F., Shang W., Hallowell S., Cronan M.: Genetic and molecular characterization of β -lactamase-negative ampicillin-resistance *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1630–1639 (2004)
25. Karlowsky J.A., Verma G., Zhanel G.G., Hoban D.J.: Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with ceftazidime resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 871–875 (2000)
26. Kilian M.: *Haemophilus*, Bergley's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. II, part B, Springer, 2005, s. 883–904
27. Kilian M.: A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* **93**(1), 9–62 (1976)
28. Kobayashi Y., Takahashi I., Nakae T.: Diffusion of β -lactam antibiotics through liposome membranes containing purified porins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 775–780 (1982)
29. Kubota T., Higa F., Kusano N., Nakasone I., Haranaga S., Tateyama M., Yamane N., Fujita J.: Genetic analyses of β -lactamase negative ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**, 36–41 (2006)
30. Laufs R., Riess F-C., Jahn G., Fock R., Kaulfers P-M.: Origin of *Haemophilus influenzae* R factors. *J. Bacteriol.* **147**, 563–568 (1981)
31. Makover S.D., Wright R., Telep E.: Penicillin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 584–588 (1981)
32. Malouin F., Schryvers A.B., Bryan L.E.: Cloning and expression of genes responsible for altered penicillin-binding proteins 3a and 3b in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 286–291 (1987)
33. Markowitz S.M.: Notes: isolation of an ampicillin-resistant, Non- β -lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 80–83 (1980)
34. Matic V., Bozdogan B., Jacobs M.R., Ubukata K., Appelbaum P.C.: Contribution of β -lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in β -lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 1018–1021 (2003)
35. Matthew M., Hedges R.W.: Analytical isoelectric focusing of R factor-determined β -lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J. Bacteriol.* **125**, 713–718 (1976)
36. Matuso Y.: abstract: *In vitro* susceptibility to 23 antimicrobial agents of *Haemophilus influenzae* from pediatric patients in Japan. *Kurume Med. J.* **47**(3), 205–210 (2000)

37. Medeiros A.A., Levesque R., Jacoby G.A.: An animal source for the ROB-1 β -lactamase of *Haemophilus influenzae* Type b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 212–215 (1986)
38. Mendelman P.M., Chaffin D.O., Stull T.L., Rubens C.E., Mack K.D., Smith A.L.: Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**, 235–244 (1984)
39. Mendelman P.M., Chaffin D.O., Musser J.M., de Groot R., Serfass D.A., Selander R.K.: Genetic and phenotypic diversity among ampicillin-resistance, non- β -lactamase-producing, non-typeable *Haemophilus influenzae* isolates. *Infect Immun.* **55**, 2585–2589 (1987)
40. Miyazaki S., Fujikawa T., Kanazawa K., Yamaguchi K.: *In vitro* and *in vivo* activities of meropenem and comparable antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae*, including β -lactamase-negative ampicillin-resistant strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 723–726 (2001)
41. Molina J.M., Cordoba J., Monsolieu A., Diosdado N., Gobernado M.: *Haemophilus influenzae* and betalactam resistance: Description of bla_{TEM} gene deletion. *Rev. Esp. Quimioterap.* **16**, 195–203 (2003)
42. Morikawa Y., Kitazato M., Mitsuyama J., Mizunaga S., Minami S., Watanabe Y.: *In vitro* activities of piperacillin against β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1229–1234 (2004)
43. Mrozińska M., Poszwińska B.: *Haemophilus influenzae* typu β -epidemiologia, klinika, profilaktyka. *Przewodnik Lekarza*, **10**, 63–70 (2002)
44. Oberhofer T.R., Back A.E.: Biotypes of *Haemophilus influenzae* encountered in clinical laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 168–174 (1979)
45. Osaki Y., Sanbongi Y., Ishikawa M., Kataoka H., Suzuki T., Maeda K., Ida T.: Genetic approach to study the relationship between penicillin-binding protein 3 mutations and *Haemophilus influenzae* β -lactam resistance by using site-directed mutagenesis and gene recombinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2834–2839 (2005)
46. Parr T.R., Bryan L.E.: Mechanism of resistance of an ampicillin-resistance, β -lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**, 747–753 (1984)
47. Przesmycki F.: Zarys bakteriologii praktycznej. Fr. Herod, Warszawa 1927
48. Sanbongi Y., Suzuki T., Osaki Y., Senju N., Ida T., Ubukata K.: Molecular evolution of β -lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2487–2492 (2006)
49. Sanchez L., Pan W., Vinas M., Nikaido H.: The acrAB homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **179**, 6855–6857 (1997)
50. Scriver S.R., Walmsley S.L., Kau C.L., Hoban D.J., Brunton J., McGeer A., Moore T.C., Witwicki E., Canadian *Haemophilus* Study Group, Low D.E.: Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1678–1680 (1994)
51. Shanahan P.M., Thomson C.J., Amyes S.G.: Abstract: Antibiotic susceptibilities of *Haemophilus influenzae* in central Scotland. *Clin. Microbiol. Infect.* **1(3)**, 168–174 (1996)
52. Skoczyńska A., Kadłubowski M., Waško I., Fiett J., Hryniewicz W.: Resistance patterns of selected respiratory tract pathogens in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 377–383 (2007)
53. Snell J.J.S., Brown D.F.J.: External quality assessment of antimicrobial susceptibility testing in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 801–810 (2001)
54. Sottnek F.O., Albritton W.L.: *Haemophilus influenzae* biotype VIII. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 815–816 (1984)
55. Straker K., Wootton M., Simm A.M., Bennett P.M., MacGowan A.P., Walsh T.R.: Cefuroxime resistance in non β -lactamase *Haemophilus influenzae* is linked to mutations in *ftsI*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 523–530 (2003)
56. Sutcliffe J.G.: Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3737–3741 (1978)
57. Syriopoulou V.Ph., Scheifele D.W., Sack C.M., Smith A.L.: Effect of inoculum size on the susceptibility of *Haemophilus influenzae* b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 510–513 (1979)
58. Takahata S., Takashi I., Senju N., Sanbongi Y., Miyata A., Maebashi K., Hoshiko S.: Horizontal gene transfer of *ftsI*, encoding penicillin-binding protein 3, in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1589–1595 (2007)
59. Tamargo I., Fuentes K., Llop A., Oteo J., Campos J.: High levels of multiple antibiotic resistance among 938 *Haemophilus influenzae* type b meningitis isolates from Cuba (1990–2002). *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 695–698 (2003)
60. Thornsberry C., Kirven L.A.: Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* as Determined by a Rapid Test for Beta-Lactamase Production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**, 653–654 (1974)
61. Trepod C.M., Mott J.E.: Identification of the *Haemophilus influenzae* *tolC* gene by susceptibility profiles of insertionally inactivated efflux pump mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1416–1418 (2004)
62. Tristram S.G.: Effect of extended-spectrum β -lactamases on the susceptibility of *Haemophilus influenzae* to cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 39–43 (2003)
63. Tristram S.G., Bozdogan B., Appelbaum P.C.: Disc diffusion-based screening tests for extended-spectrum β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 570–573 (2005)
64. Tristram S.G., Hawes R., Soupronov J.: Variation in selected regions of bla_{TEM} genes and promoters in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 481–484 (2005)
65. Tristram S.G., Pitout M.J., Forward K., Campbell S., Nichols S., Davidson R.J.: Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 509–514 (2008)
66. Ubukata K., Shibasaki Y., Yamamoto K., Chiba N., Hasegawa K., Takeuchi Y., Sunakawa K., Inoue M., Konno M.: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1693–1699 (2001)
67. Zerva L., Biedenbach D. J., Jones R. N.: Reevaluation of interpretive criteria for *Haemophilus influenzae* by using meropenem (10-microgram), imipenem (10-microgram), and ampicillin (2- and 10-microgram) disks. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1970–1974 (1996)

Michał Więckowicz

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48, 60-623 Poznań, e-mail: wieckom@au.poznan.pl

Wpłynęło w październiku 2008 r.

1. Wstęp. 2. rDNA. 3. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). 4. PCR-TGGE/DGGE. 5. ARDRA i T-RFLP. 6. RISA. 7. Podsumowanie

Molecular methods for the identification of microorganisms in complex communities

Abstract: Taxonomical identification of microorganisms in complex communities is of high importance for different branches of biological sciences, for example food technology, ecology, and medicine. Molecular, rDNA-dependent methods for detection and identification of microorganisms allow rapid, precise and reliable analysis of such microbial communities. In comparison to traditional, culture-dependent techniques, molecular methods are less labour-consuming, they allow identification of as yet uncultured microorganisms and are under constant development, thus have better perspectives for use in the future. These molecular techniques can be used to estimate both qualitative and quantitative fluctuations in a microbial population of interest and are also helpful in estimating its complexity. In this paper, the most commonly used molecular, culture-independent, rDNA-based methods for microbial discrimination within complex communities and their application are described.

1. Introduction. 2. rDNA. 3. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH). 4. PCR-TGGE/DGGE. 5. ARDRA and T-RFLP. 6. RISA. 7. Conclusions

Słowa kluczowe: Identyfikacja, populacja mikroorganizmów, rDNA

Key words: Identification, microbial population, rDNA

1. Wstęp

Identyfikacja mikroorganizmów znajdujących się w złożonych ekosystemach, takich jak żywność, przetwory pokarmowe, gleba czy ścieki, jest niezwykle ważna z punktu widzenia m.in. technologii produkcji żywności, zdrowia, ekologii i bezpieczeństwa. Zmiana składu mikrobiologicznego w takich ekosystemach narusza ich równowagę i może wywoływać znamienne w skutkach konsekwencje. Przykładowo, w technologii żywności zmiana składu mikrobiologicznego, zarówno podczas produkcji, jak i w gotowym produkcie, może wpływać na zmianę składu chemicznego, zmianę właściwości organoleptycznych oraz funkcjonalności żywności. Z kolei naruszenie równowagi w środowisku mikroflory jelitowej może skutkować ryzykiem zachorowania na wiele chorób przewodu pokarmowego.

Istnieje szereg metod służących identyfikacji mikroorganizmów w złożonych ekosystemach. Różnią się one potencjałem identyfikacji, powtarzalnością oraz wymaganym nakładem pracy. Metody te można podzielić na konwencjonalne – wykorzystujące hodowle

mikroorganizmów i polegające na oznaczaniu cech fenotypowych komórek, a także na metody wykorzystujące techniki biologii molekularnej do oznaczania cech genotypowych, gdzie w większości wstępne prowadzenie hodowli nie jest obligatoryjne [17]. Tradycyjne metody identyfikacji mikroorganizmów oparte na technikach hodowlanych są z reguły tańsze i mniej skomplikowane niż metody oparte na genotypowaniu. Występują również w postaci wygodnych, zminiaturyzowanych zestawów, jak np. zestawy API. Do niewątpliwych wad tych metod należy jednak ich niewielka rozdzielczość (pozwalają na rozróżnienie mikroorganizmów do poziomu rodzaju, względnie gatunku). Ponadto, tradycyjne techniki hodowlane nie pozwalają na identyfikację oraz skuteczne rozróżnienie mikroorganizmów posiadających jednocześnie różne genotypy oraz zbliżone cechy fenotypowe [17].

Ponadto, w przypadku słabo poznanych mikroorganizmów istnieje potrzeba zapewnienia specyficznych wymagań pokarmowych, co wiąże się z problemami zdefiniowania składu odpowiedniej pożywki hodowlanej. Techniki polegające na genotypowaniu pozwalają więc na identyfikację mikroorganizmów,

niezdolnych do wzrostu *in vitro* w hodowli, lub dla których warunki hodowli nie zostały zdefiniowane. Częstym problemem jest również konieczność zachowania bezwzględnie beztlenowych warunków podczas hodowli i pasażowania komórek [19].

Identyfikacja mikroorganizmów wykorzystująca techniki biologii molekularnej pozwala na szybkie i precyzyjne określenie przynależności filogenetycznej badanego mikroorganizmu na poziomie rodzaju, gatunku, a nawet szczepu. Techniki te opierają się głównie na analizie wybranych genów. Analiza taka odbywa się bezpośrednio *in situ*, albo też po izolacji kwasów nukleinowych z komórki. Molekularna identyfikacja mikroorganizmów odbywa się najczęściej poprzez analizę rDNA, głównie genu kodującego 16S rRNA, która to cząsteczka wchodzi w skład małej podjednostki rybosomu prokariotycznego. Gen ten występuje u wszystkich organizmów prokariotycznych, a stopień różnicowania jego sekwencji jest wprost proporcjonalny do dystansu filogenetycznego między badanymi mikroorganizmami. Obecnie w bazach danych zgromadzono kilkadziesiąt tysięcy wpisów sekwencji tego genu, co pozwala na precyzyjne zidentyfikowanie wielu gatunków i szczepów mikroorganizmów. Analiza rDNA wykorzystywana jest najczęściej do identyfikacji mikroorganizmów pochodzących z umiarkowanie zróżnicowanych ekosystemów. W innych przypadkach, szczególnie gdy chodzi o zidentyfikowanie dwu lub więcej blisko spokrewnionych szczepów, bardziej zasadna wydaje się analiza genów kodujących białka, takich jak białka szoku cieplnego, ATPazy, dehydrogenazy i inne [8] z powodu mniejszego zakonserwowania ewolucyjnego sekwencji tych genów.

W pracy przedstawione i scharakteryzowane zostaną najważniejsze i najczęściej stosowane molekularne metody identyfikacji mikroorganizmów oparte na analizie rDNA, takie jak FISH (ang.: Fluorescent *in situ* Hybridization), PCR-TGGE/DGGE (Polymerase Chain Reaction – Thermal Gradient Gel Electrophoresis/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) i T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) oraz RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) [5].

2. rDNA

Identyfikacja mikroorganizmów wykorzystująca techniki biologii molekularnej, a pozwalająca na określenie składu jakościowego złożonych ekosystemów, opiera się najczęściej na analizie sekwencji kwasów nukleinowych. Metodyka ta pozwala na najbardziej precyzyjne określenie struktury mikrobiologicznej złożonych ekosystemów [2].

Obecnie najczęściej wykorzystuje się sekwencje genów kodujących cząsteczki rRNA (tzw. rDNA). Analizie poddaje się geny cząsteczek małej podjednostki rybosomu prokariotycznego (16S rRNA) oraz dużej podjednostki rybosomu prokariotycznego (23S rRNA). Ponieważ w komórkach występuje wiele kopii genów rRNA, a ponadto zawierają one zarówno regiony konserwatywne, jak i wysoce zmienne, stanowią one idealny wyznacznik zmienności filogenetycznej. Również brak poziomego transferu tych genów między komórkami oraz długość tych fragmentów (ok. 1500 pz dla 16S oraz ok. 3000 pz dla 23S rRNA) stanowią o użyteczności tych sekwencji przy identyfikacji mikroorganizmów [3].

Dzięki istnieniu stale rozwijających się i darmowych baz danych zawierających wpisy sekwencji rDNA, przy zastosowaniu odpowiedniego oprogramowania (pozwalającego np. na wypróbowanie specyficzności sond molekularnych *in silico*) można w sposób kompleksowy zaprojektować doświadczenia służące analizie porównawczej badanych mikroorganizmów. Wyniki takich badań pozwalają na precyzyjne rozróżnienie pozycji filogenetycznej mikroorganizmów zasiedlających dany ekosystem [2].

3. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* jest sprawną i wysoce specyficzną techniką identyfikacji pojedynczych komórek drobnoustrojów w ich naturalnym środowisku. W tej metodzie identyfikacja mikroorganizmów zachodzi dzięki hybrydyzacji oligonukleotydom sondy molekularnej o znanej sekwencji z fragmentem genomu bądź transkryptomu badanych komórek [11]. Sonda molekularna najczęściej znakowana jest cząsteczką fluorochromu, co umożliwia bezpośrednią detekcję przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego bądź zautomatyzowaną analizę ilościową z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Należy zauważyć, iż specyficzność hybrydyzacji uzależniona jest całkowicie od sekwencji sondy [6].

Sekwencją docelową hybrydyzacji w badaniach nad składem mikrobiologicznym ekosystemów jest najczęściej cząsteczka 16S rRNA. Standardowe postępowanie obejmuje wstępne przygotowanie i permeabilizację komórek, hybrydyzację, wymywanie nadmiaru niezwiązanej sondy oraz detekcję sygnału. Sonda molekularna to cząsteczka oligonukleotydoma, najczęściej o długości od 15 do 30 nukleotydów, znakowana na jednym bądź z obu końców znacznikiem fluorescencyjnym. Sondy najczęściej znakowane są bezpośrednio przez przyłączenie cząsteczki fluorochromu. Do najczęściej stosowanych znaczników należą pochodne fluoresceiny (np. FITC), pochodne rodminy (np. TRITC), Texas

Red oraz barwniki karbocyjaninowe (np. Cy3 i Cy5). Sonda znakowana może być również pośrednio – w takim przypadku cząsteczka reporterowa (np. digoksygenina) wiązana jest przez znakowane fluorescencyjne specyficzne przeciwciała [11]. W toku jednej analizy można stosować wiele różnokolorowych sond molekularnych, co pozwala na uwidocznienie i identyfikację kilku rodzajów, gatunków bądź szczepów mikroorganizmów równocześnie [1].

Pomimo wielu zalet, metoda FISH nie jest jednak wolna od wad. Po pierwsze, nie wszystkie komórki bakteryjne mogą z łatwością podlegać permeabilizacji przeprowadzanej na podstawie powszechnie używanych protokołów metodologicznych. Po drugie, wykorzystanie sondy dla cząsteczki 16S rRNA znakowanej na jednym końcu ogranicza wykorzystanie techniki FISH wyłącznie do identyfikacji bakterii o małej liczbie rybosomów. Ponadto trudności może wywoływać konieczność dostosowywania warunków hybrydyzacji dla szczepów nowoodkrytych. Efektywność hybrydyzacji może również zależeć od stopnia skomplikowania struktury rybosomu. W przypadku rybosomów o zwartej strukturze, zdolność sondy molekularnej do hybrydyzacji może być ograniczona, co w efekcie może dawać wyniki fałszywie negatywne [18].

Technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* zastosowano w wielu badaniach z dziedziny technologii żywności. Posłużyła ona m.in. do określenia składu mikrobiologicznego populacji zasiedlającej sałatki warzywne pakowane w atmosferze modyfikowanej, a także pozwoliła na detekcję bakterii z rodzaju *Listeria* w mleku [15]. Zastosowano ją również do identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z wina. FISH zastosowano także do wytypowania szczepów o właściwościach probiotycznych spośród 297 izolatów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [17].

Technika FISH znajduje szerokie zastosowanie w analizie medycznej. Sonda molekularna znakowana Cy3 została wykorzystana do identyfikacji krętków z rodzaju *Treponema*, odpowiedzialnych za wywoływanie zmian zapalnych w obrębie skóry palców w przebiegu kiły. Inne sondy oligonukleotydowe znakowane fluorescencyjnie zostały użyte do identyfikacji bakterii *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* oraz *Prevotella intermedia* pochodzących z płytki nazębnej powstałej w przebiegu zapalenia przyzębia. Technikę tę użyto również do określenia i monitorowania składu mikroflory jamy ustnej, w obrębie której dla wielu mikroorganizmów nie opracowano jak dotąd warunków hodowli [11]. Z powodów zdrowotnych i bezpieczeństwa zdrowotnego, ogromną rolę pełni stabilny i zrównoważony skład mikroflory jelitowej. Analiza składu mikrobiologicznego mikroflory jelitowej człowieka dotyczy najczęściej kału. FISH pozwala na identyfikację i detekcję szczepów

patogennych dla człowieka (np. *Salmonella*) oraz przykładowo umożliwia detekcję obecności szczepów probiotycznych, co pomaga w ocenie aktywności i skuteczności preparatów probiotycznych. Hybrydyzacja *in situ* może służyć również do identyfikacji mikroorganizmów wywołujących zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych, takich jak np. *Haemophilus influenzae*. Metodę tę wykorzystuje się również do detekcji patogenów wywołujących zakażenia w przebiegu mukowiscydozy (np. *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* i *Candida albicans*) [11].

FISH znajduje również zastosowanie w medycynie weterynaryjnej do detekcji i identyfikacji mikroorganizmów patogennych dla bydła i trzody chlewnej, takich jak *Brachyspira pilosicoli* oraz *Serpulina intermedia*. Technika ta stanowi użyteczne narzędzie do wykrywania i filogenetycznego klasyfikowania patogenów porażających uprawy roślinne np. *Clavibacter michiganensis* oraz *Ralstonia solanacearum* atakujących uprawy ziemniaka [11].

Technikę FISH z powodzeniem wykorzystano również w analizie składu mikrobiologicznego bakterioplanktonu wody morskiej oraz w badaniach limnologicznych nad występowaniem bakterii siarkowych spokrewnionych z bakteriami *Desulfocapsa thiozymogenes* [1]. Metodę tę stosowano również w monitoringu wodociągowej wody pitnej oraz do analizy mikrobiologicznej biofilmu powstającego wewnątrz rur wodociągowych pod kątem występowania bakterii z rodzaju *Aquabacterium* [11]. Ponadto technikę FISH można wykorzystać do identyfikacji mikroorganizmów i obserwacji fluktuacji w składzie jakościowym osadu czynnego używanego w procesie oczyszczania ścieków. Technika hybrydyzacji *in situ* posłużyła także do identyfikacji obligatoryjnie symbiotycznych bakterii zasiedlających organizmy eukariotyczne, np. bakterii z rodzaju *Holospira* zasiedlających komórki orzęsków *Paramecium caudatum* oraz bakterii nitryfikacyjnych żyjących w symbiozie z trzciną cukrową [11].

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* stanowi precyzyjne i wygodne narzędzie umożliwiające szybką i wiarygodną identyfikację obecności, liczby i dystrybucji mikroorganizmów w złożonych populacjach. Technika ta, jakkolwiek nie wolna od wad, stanowi doskonały środek do badania złożonych mikrobiologicznie ekosystemów. Służy zarówno badaniom z zakresu analityki medycznej, gdzie pozwala na szybkie i precyzyjne stwierdzanie obecności mikroorganizmów patogennych, jak badaniom z zakresu ekologii środowiska, gdzie umożliwia monitorowanie procesów technologicznych uzdatniania wody. Spektrum zastosowania tej techniki jest bardzo szerokie. Pozwala ona na badania jakościowe i ilościowe, zarówno z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego z analizą ikonograficzną, jak i przy zastosowaniu cytometrii przepływowej.

4. PCR-TGGE/DGGE

Technika PCR połączona z rozdziałem elektroforetycznym w gradiencie czynnika denaturującego (temperatury lub chemicznego), stanowi jedną z metod określanych mianem tzw. genetycznego odcisku palca (*genetic fingerprinting*). Techniki te pozwalają na określenie profilu jakościowego i zróżnicowania w obrębie populacji mikroorganizmów [13].

Przedmiotowa metoda polega na rozdziale elektroforetycznym w gradiencie temperatury bądź czynnika denaturującego, zamplifikowanych w toku PCR fragmentów DNA o równej długości, ale różnej sekwencji. Rozdział takich fragmentów oparty jest na zjawisku zmniejszonej migracji częściowo zdenaturowanych cząsteczek DNA w żelu poliakryloamidowym zawierającym liniowy gradient czynnika denaturującego (najczęściej mieszaniny mocznika i formamidu), względnie poddanego działaniu liniowego gradientu termicznego. Topnienie dwuniciowej cząsteczki DNA zachodzi domenowo, a uzależnione jest całkowicie od jej sekwencji. W momencie gdy domena o najniższej temperaturze topnienia (T_m) osiągnie ją w danym miejscu na żelu, struktura podwójnej helisy ulegnie denaturacji i migracja takiej cząsteczki ulegnie spowolnieniu. Różnice w sekwencji badanego fragmentu DNA skutkują różnicami w temperaturach topnienia poszczególnych domen w obrębie tego fragmentu i w efekcie różna jest odległość, na jaką migrują cząsteczki podczas rozdziału elektroforetycznego [13].

Technika TGGE/DGGE pozwala na wykrycie ok. 50% różnic w sekwencjach badanego genu, o ile jego długość nie przekracza ok. 500 p.z. Skuteczność tę można zwiększyć niemal do 100% przez wzbogacenie sekwencji w krótki fragment (ok. 30–50 p.z.) o wysokiej temperaturze topnienia bogaty w nukleotydy GC (tzw. *GC-clamps*). Sekwencja bogata w nukleotydy GC zostaje umieszczona na końcu 5' jednego ze starterów PCR i tym samym wprowadzona do amplikonu. Pozwala to na podwyższenie temperatury topnienia jednego z końców analizowanej sekwencji, co zapobiega całkowitej denaturacji badanej cząsteczki DNA w toku elektroforezy [13].

Rozdział elektroforetyczny uwidacznia się barwnikami fluorescencyjnymi (np. bromkiem etydy, SYBR Green) i ocenia wykorzystując transiluminator UV. Alternatywnie można stosować barwienie solami srebra [13].

Technikę PCR połączoną z rozdziałem elektroforetycznym w gradiencie termicznym lub gradiencie czynnika denaturującego z powodzeniem stosuje się w badaniach nad detekcją i identyfikacją filogenetyczną mikroorganizmów w złożonych ekosystemach. Sekwencją docelową dla PCR w takich badaniach jest najczęściej fragment genomu kodujący cząsteczki rRNA (rDNA).

Analiza genów kodujących cząsteczki 16S rRNA, służąca badaniu zróżnicowania w obrębie populacji mikroorganizmów, znalazła zastosowanie w technologii żywności m.in. do analizy składu mikrobiologicznego kultur starterowych w przemyśle fermentacyjnym, a także składu jakościowego kultur bakterii kwasu mlekowego wykorzystywanych do produkcji serów i innych produktów fermentowanych [17]. Ponadto, technika ta posłużyła do wskazania różnic w składzie mikrobiologicznym populacji zasiedlających ryzosferę ziemniaka transgenicznego i tradycyjnego [13]. Technika ta okazała się użyteczna również w badaniach nad wpływem introdukcji preparatów probiotycznych na zmiany jakościowe w obrębie mikroflory jelitowej człowieka [8]. Inne badania wykorzystujące technikę PCR-TGGE/DGGE pozwoliły na ocenę dystrybucji bakterii nityfikacyjnych w nadmorskich wydmach. Również w badaniach limnologicznych metodyka ta znalazła zastosowanie, a mianowicie w badaniu obecności Archea w polodowcowych zbiornikach wodnych w Norwegii [12]. Przedmiotowa technika może być zastosowana w ocenie zróżnicowania filogenetycznego i składu ilościowego mikroorganizmów w obrębie mikroflory jelitowej człowieka [16], a także zwierząt hodowlanych – trzody chlewnej, bydła i drobiu [19]. Stosuje się ją również do detekcji szczepów z rodzaju *Actinomyces* z populacji mikroorganizmów pochodzących z różnych próbek gleby. Technika PCR-TGGE/DGGE znajduje szerokie zastosowanie w badaniach nad ekologią mikroorganizmów, m.in. w analizie dynamiki zmian ilościowych i jakościowych w populacjach mikroorganizmów wywołanych zmianami zachodzącymi w środowisku. Technika ta posłużyła do oceny sezonowych fluktuacji składu bakterioplanktonu u wybrzeży Antarktyki [12].

Technika identyfikacji mikroorganizmów w złożonych populacjach z wykorzystaniem amplifikacji sekwencji rDNA połączonej z rozdziałem elektroforetycznym w gradiencie termicznym lub gradiencie chemicznego czynnika denaturującego jest metodą niezawodną, szybką i tanią, a także gwarantującą powtarzalność wyników. Pozwala na jednoczesne analizowanie wielu prób, co w badaniach ekologicznych, badaniach dotyczących składu mikrobiologicznego żywności czy też w doświadczeniach z dziedziny analityki medycznej stanowi niezaprzeczalną zaletę. Należy jednak zwrócić uwagę na wady tej techniki, do których należą formowanie heterodupleksów DNA, ograniczona zdolność rozdzielcza dla fragmentów DNA pochodzących ze szczepów słabo reprezentowanych w danej populacji oraz brak wysokiej zdolności rozdzielczej dla małych fragmentów DNA [12]. Ponadto należy zauważyć, iż na wyniki analizy ma również wpływ liczba cykli amplifikacji zaprogramowana dla danej analizy PCR. Im większa bowiem liczba cykli

amplifikacji, tym większe prawdopodobieństwo, że zachodzić będzie rehybrydyzacja cząsteczki DNA uniemożliwiająca hybrydyzację starterów, co w efekcie może skutkować zafałszowaniem wyników. Problem ten dotyczy w szczególności prób słabo reprezentowanych w badanej populacji, dlatego zaleca się stosowanie jak najmniejszej liczby cykli PCR [4].

5. ARDRA i T-RFLP

Analiza restrykcyjna zamplifikowanych fragmentów rDNA (ARDRA) oraz jej odmiana – T-RFLP, czyli analiza polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych, są kolejnymi metodami tzw. genetycznego odcisku palca. Techniki te służą szybkiej oceny składu jakościowego złożonych populacji mikroorganizmów. Technika ARDRA polega na analizie restrykcyjnej zamplifikowanych w toku PCR fragmentów genomu kodujących cząsteczki 16S rRNA. W pierwszym etapie analizy, fragmenty rDNA zostają zamplifikowane z wykorzystaniem uniwersalnych starterów dla rDNA. W drugim etapie, produkty PCR poddaje się trawieniu enzymami restrykcyjnymi rozpoznającymi motywy czteronukleotydowe. Produkty trawienia rozdziela się elektroforetycznie na żelach agarozowych lub poliakryloamidowych o wysokiej rozdzielczości. W ten sposób różnice w sekwencji genów rRNA wynikające z dystansu filogenetycznego mikroorganizmów tworzących badany ekosystem, przekładają się na obraz na żelu i mogą być interpretowane pod kątem składu jakościowego takiej populacji [9]. W omawianej metodzie, szczególnie ważną rolę pełni odpowiedni dobór enzymów restrykcyjnych, ponieważ ma on decydujący wpływ na rozdzielczość i zdolność różnicującą rozdziału elektroforetycznego [14].

Główną zaletą tej metody jest wygoda i stosunkowo niewielki nakład pracy potrzebny do jej wykonania. Pozwala ona na monitorowanie zmian ilościowych w złożonych populacjach mikroorganizmów. Nie daje jednak informacji na temat składu jakościowego populacji, ponieważ jako wynik otrzymuje się obraz elektroforetyczny dający ogólne pojęcie o różnorodności na poziomie rodzajów, gatunków czy też szczepów ją tworzących [14]. Stąd istnieje potrzeba stosowania metody alternatywnej, uzupełniającej metodykę ARDRA w zakresie identyfikacji jakościowej. Technika taką jest T-RFLP, która opiera się na analizie restrykcyjnej produktów PCR znakowanych fluorescencyjnie, co możliwe jest dzięki wykorzystaniu starterów oligonukleotydowych znaczonej cząsteczką fluorochromu na końcach 5'. Odczyt obrazu po rozdziale elektroforetycznym odbywa się automatycznie, a przedstawia on wyłącznie pozycje fragmentów terminalnych. Obraz taki porównuje się z istniejącymi bazami da-

nych i w ten sposób można wnioskować o strukturze jakościowej badanej populacji mikroorganizmów [8].

Analiza ARDRA z powodzeniem posłużyła do oceny zróżnicowania mikrobiologicznego w obrębie danej populacji, bez wnikania w jej szczegółowy skład jakościowy, tzn. określania obecności konkretnych gatunków lub szczepów mikroorganizmów. Technikę tę stosowano przy ocenie zmian w populacji mikroorganizmów zasiedlających glebę pod wpływem emisji do środowiska substancji szkodliwych. Metodę tę użyto również do oceny stopnia podobieństwa populacji zasiedlających próbki gleby z różnych źródeł. ARDRA może również służyć do oceny struktury genetycznej populacji należącej do określonej grupy filogenetycznej [14]. Technikę T-RFLP stosuje się w celu szczegółowej analizy składu mikrobiologicznego populacji pochodzących z różnych źródeł. Wykorzystano ją m.in. do określenia składu mikrobiologicznego kultur starterowych do produkcji żywności fermentowanej. Ponadto, technika ta znalazła zastosowanie w wyodrębnieniu 35 szczepów bakterii *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* i *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* w tychże kulturach [17]. T-RFLP posłużyła także do wskazania przynależności filogenetycznej mikroorganizmów zasiedlających przewód pokarmowy termitów. Dzięki T-RFLP można również określić i monitorować dynamikę zmian w składzie mikrobiologicznym osadu czynnego w oczyszczalniach ścieków, a także różnicować próbki gleby z różnych źródeł pod kątem obecności specyficznych grup mikroorganizmów [8].

Wyżej opisane metody detekcji i identyfikacji mikroorganizmów w złożonych ekosystemach w pozytywny sposób służą zarówno monitorowaniu zmian ilościowych i określaniu struktury genetycznej populacji (ARDRA), jak i ścisłej identyfikacji filogenetycznej drobnoustrojów tworzących daną populację (T-RFLP). Metody te sprawdzają się najlepiej w badaniach porównawczych między populacjami pochodzącymi z różnych źródeł. Technika T-RFLP pozwala na identyfikację mikroorganizmów do poziomu rodzaju, gatunku, a nawet szczepu. Ponadto, dzięki istnieniu systematycznie aktualizowanych baz danych, stanowi znakomite narzędzie o ciągle wzrastającym potencjale, służące do badań nad strukturą mikrobiologiczną ekosystemów [10].

6. RISA

Analiza długości sekwencji międzygenowej (tzw. *spacer*) rDNA jest kolejną metodą umożliwiającą identyfikację mikroorganizmów wchodzących w skład populacji danego ekosystemu. RISA polega na analizie polimorfizmu długości sekwencji fragmentu łącznikowego DNA występującego między genami 16S oraz 23S rRNA w genomie bakteryjnym [14].

Fragment łącznikowy DNA położony pomiędzy genami 16S oraz 23S rRNA jest fragmentem o wysokim polimorfizmie długości sekwencji, dlatego też może być wykorzystywany do identyfikacji mikroorganizmów. Fragment ten na końcach 3' i 5' zawiera sekwencje rozpoznawane przez rybonukleazę III, pomiędzy którymi znajduje się fragment *boxA* zapobiegający przedwczesnej terminacji transkrypcji. W obrębie fragmentu intergenowego mogą znajdować się również geny tRNA, jednak jest to cecha specyficzna gatunkowo. Region międzygenowy zawiera nie więcej niż 50% sekwencji pełniących określone funkcje w operonie, resztę natomiast stanowią sekwencje niekodujące, narażone na częste mutacje insercji i delecji. Dzięki temu region ów znakomicie nadaje się do różnicowania mikroorganizmów przez określenie polimorfizmu długości sekwencji [7].

Pierwszym etapem analizy jest przeprowadzenie PCR, w toku której zamplifikowany zostaje fragment łącznika międzygenowego wraz z krótkim fragmentem genu 16S rRNA i 23S rRNA, dając w efekcie amplikony o długości od kilkuset do ok. 1500 pz o dodatkowo zwiększonej polimorficzności. Następnie produkty PCR poddaje się rozdziałowi elektroforetycznemu w żelach agarozowych lub poliakrylamidowych [7].

Z uwagi na wysoki polimorfizm długości sekwencji łącznika międzygenowego, różnice występują między bardzo blisko spokrewnionymi mikroorganizmami, a nawet w obrębie tej samej komórki, gdy dany operon występuje w wielu kopiach. Dzięki temu, technika RISA stanowi wyjątkowo użyteczne narzędzie do określania struktury populacji mikroorganizmów tworzących dany ekosystem [7].

Przedmiotową technikę wykorzystano m.in. w badaniach nad wpływem zmian w środowisku wywołanych emisją substancji toksycznych na skład jakościowy populacji mikroorganizmów zasiedlających to środowisko. RISA znalazła zastosowanie również w badaniach porównawczych składu mikrobiologicznego gleby pochodzącej z różnych źródeł [14].

Ponadto, metodę tę zastosowano do oceny chwilowych i trwałych fluktuacji w populacji mikroorganizmów tworzących bakterioplankton występujący w otwartych wodach oceanicznych. Co więcej, technikę tę użyto również do określenia składu bakterioplanktonu w zależności od głębokości, na której występuje [7].

Analiza polimorfizmu długości sekwencji łącznika międzygenowego stanowi użyteczne narzędzie do oceny składu mikrobiologicznego badanych populacji. Dzięki temu, że jest niezawodna i łatwa w wykonaniu, analiza ta znalazła wszechstronne zastosowanie w badaniach nad niemal wszystkimi rodzajami bakterii, również nad archea. Technika ta jest użyteczna w wielu dziedzinach, w których wykorzystuje się analizy mikro-

biologiczne, m.in. w badaniach ekologicznych, klinicznych, taksonomicznych i filogenetycznych.

Należy wspomnieć również o wadach tej metody, do której przede wszystkim należy nieprzewidywalność różnic międzygatunkowych w sekwencji fragmentu łącznikowego. Różnice w sekwencji mogą wynikać z dużego dystansu filogenetycznego, mogą jednak występować w obrębie jednego szczepu lub nawet jednej komórki. Z tego względu zaleca się stosowanie techniki RISA do analizy składu jakościowego mało zróżnicowanych rodzajowo i gatunkowo populacji mikroorganizmów [7].

7. Podsumowanie

Molekularne metody identyfikacji mikroorganizmów w złożonych ekosystemach pozwalają na szybkie, wiarygodne i precyzyjne badanie struktury populacji mikroorganizmów tworzących dany ekosystem. W porównaniu z tradycyjnymi metodami hodowlanymi, pozwalają na zmniejszenie nakładu pracy oraz dają większe możliwości modyfikacji metodologii.

Wyżej opisane techniki pozwalają na ocenę struktury populacji mikroorganizmów, ocenę zmian ewolucyjnych w jej obrębie, a także na określenie złożoności populacji bez potrzeby przeprowadzania hodowli mikroorganizmów. Mogą one posłużyć do detekcji wybranych drobnoustrojów w danym ekosystemie, jak również pozwalają na określenie roli danego mikroorganizmu w populacji i tym samym mogą wskazywać na konsekwencje fluktuacji w jej składzie jakościowym. Wiele z opisanych metod wykorzystuje technikę PCR, przez co są szybkie, precyzyjne i dają wysoce jednoznaczne wyniki. Dzięki wykorzystaniu ciągle aktualizowanych baz danych, stwarzają również możliwości standaryzacji metodyki [8].

Metody te jednak nie są pozbawione wad. Do najważniejszych należy zaliczyć błędy generowane przez technikę PCR, niską detekcję mikroorganizmów słabo reprezentowanych w danej populacji, a także ryzyko niezamierzonego zakłócenia składu populacji izolowanej ze środowiska o skomplikowanej strukturze (np. z żywności, dna morskiego itp.). Istnieje również ryzyko uwzględnienia obecności mikroorganizmów martwych w populacji, poprzez przedostania się do prób DNA martwych komórek [8].

Reasumując należy stwierdzić, iż metody identyfikacji mikroorganizmów wykorzystujące zdobycze biologii molekularnej stanowią stale poszerzające się i podlegające ulepszeniom grono technik analitycznych, które dzięki swej prostocie, wiarygodności i precyzyjności, służą badaniom mikrobiologicznym w zakresie wszystkich dziedzin nauk przyrodniczych.

Piśmiennictwo:

1. Amann R., Fuchs B.M., Behrens S.: The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 231–236 (2001)
2. Amann R., Ludwig W.: Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 555–565 (2004)
3. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H.: Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143–169 (1995)
4. Bonnet R., Suau A., Dore J., Gibson G.R., Collins M.D.: Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 757–763 (2002)
5. Dahlloef I.: Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 213–217 (2002)
6. De Boer E., Beumer R.R.: Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 119–130 (1999)
7. Garcia-Martinez J., Acinas S.G., Anton A.I., Rodriguez-Valera F.: Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods*, **36**, 55–64 (1999)
8. Giraffa G., Neviani E.: DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **67**, 19–34 (2000)
9. Liu W.-T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J.: Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism of Genes Encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4516–4522 (1997)
10. Marsh T.L.: Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 323–327 (1999)
11. Moter A., Goebel U.B.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, **41**, 85–112 (2000)
12. Muyzer G.: DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 317–322 (1999)
13. Muyzer G., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127–141 (1998)
14. Ranjard L., Poly F., Nazaret S.: Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* **151**, 167–177 (2000)
15. Rudi K., Nogva H.K., Moen B., Nissen H., Bredholt S., Moeretroe T., Naterstad K., Holck A.: Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **78**, 171–180 (2002)
16. Satokari R.M., Vaughan E.E., Smidt H., Saarela M., Maetoe J., de Vos W.M.: Molecular Approaches for the Detection and Identification of Bifidobacteria and Lactobacilli in the Human Gastrointestinal Tract. *System. Appl. Microbiol.* **26**, 572–584 (2003)
17. Temmerman R., Huys G., Swings J.: Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 348–359 (2004)
18. Wagner M., Horn M., Daims H.: Fluorescence in situ hybridization for the identification and characterization of prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 302–309 (2003)
19. Zoetendal E.G., Collier C.T., Koike S., Mackie R.I., Gaskins R.: Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *J. Nutr.* **134**, 465–472 (2004)

Recenzje książek

„Reagowanie systemu zdrowia publicznego na broń biologiczną i chemiczną: Przewodnik WHO”
Public Health Response to Biological and Chemical Weapons: WHO Guidance.
Wydanie II, WHO, Genewa 2004, 357 s,
ISBN: 92-4-1546158-8

Pierwsze wydanie przewodnika WHO ukazało się w 1970 r. Był to czas, kiedy USA jednostronnie ogłosiły zaprzestanie badań, konstruowania, produkcji i zniszczenie zmagazynowanych zapasów broni biologicznej. Stopniowo do tej inicjatywy dołączyły prawie wszystkie kraje i uchwaliły odpowiednią konwencję. Potrzeba było upływu kolejnych kilku lat, by taki sam los spotkał i broń chemiczną. Wydawało się, że wszelkie rodzaje broni masowej zagłady przejdą do historii jako relikty dwóch wojen światowych i długiego okresu zimniej wojny.

Niestety, już u progu nowego stulecia ludzkość weszła w nową, niespotykaną dotychczas pod względem zasięgu i rozmiarów, erę terroru organizowanego przez międzynarodowe organizacje przestępcze. Z różnych pobudek przyjęły one jako formę walki sianie bezwzględного terroru wszelkimi dostępnymi środkami, w tym przy użyciu broni biologicznej i chemicznej.

WHO uznała więc za konieczne przerehabilitowanie na nowo przewodnika z 1970 r., z uwzględnieniem doświadczeń ludzkości zgromadzonych w okresie ostatnich 30 lat, a szczególnie z okresu przełomu wieków. Doświadczenia z terroryzmem biologicznym i chemicznym ilustrują atak sarinem w Tokio w 1995 r. i ataki wąglkowe w USA w 2001 r. Doświadczenia te wskazują, że ataki nawet o tak ograniczonej skali mogą mieć głęboki ogólnoswiatowy oddźwięk i odsłaniają słabość podejmowanych przedsięwzięć zaradczych.

W ocenie tych przedsięwzięć podkreśla się brak szybkiego monitoringu bakteriologicznego, zbyt późne rozpoznanie klinicznych postaci wąglka oraz rozpoczęcie akcji informowania społeczeństwa o tym zagrożeniu. Podkreśla się też, że w pla-

nach przedsięwzięć Centrum Zwalczenia Chorób w USA nie uwzględniano w ogóle możliwości przesyłania przez terrorystów w listach sproszkowanych przetrwalników laseczek wąglka. Zastrzeżenie to jest o tyle istotne, że od szeregu lat notowano w USA wiele przypadków „żartów” z przesyłaniem listów zawierających pozorowane sproszkowane zarazki.

Treść przewodnika w tłumaczeniu polskim zawarta jest na 328 stronach i zgodnie z oryginałem podzielona na 6 rozdziałów oraz 7 obszernych aneksów. Poza przedmową i innymi dodatkami, kolejne rozdziały zatytułowane są następująco:

1. Wprowadzenie;
2. Ocena zagrożenia w odniesieniu do zdrowia publicznego;
3. Czynniki biologiczne i chemiczne;
4. Przygotowanie zdrowia publicznego i reagowanie;
5. Aspekty prawne;
6. Międzynarodowe źródła pomocy.

Większą część treści przewodnika wypełnia 7 aneksów zatytułowanych kolejno:

1. Czynniki chemiczne;
2. Toksyny;
3. Czynniki biologiczne;
4. Podstawy ochrony;
5. Ostrzeżenia przed sabotażem w stosunku do wody pitnej, żywności i innych produktów;
6. Źródła informowania;
7. Afiliacja państw będących członkami WHO do międzynarodowych umów o broni biologicznej i chemicznej.

Przewodnik w tłumaczeniu na język polski wydał Ośrodek Diagnostyki i Zwalczenia Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii (24-100 Puławy, ul. Lubelska 2).

O szczegółach dotyczących zakupu przewodnika można uzyskać informacje pod telefonem 0 81 5519803.

Prof. dr hab. Jerzy Mierzejewski,
ul. Wojska Polskiego 5 m. 4 24-100 Puławy
e-mail: mierzjer@poczta.omet.pl

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Mikrobiologii zamieszczają artykuły przeglądowe ze wszystkich dziedzin mikrobiologii nie drukowane w innych czasopismach oraz w dziale Nowości Wydawniczych recenzje nowych książek z zakresu mikrobiologii i nauk pokrewnych, które ukazują się w Polsce. Artykuły drukowane w *Postęпах Mikrobiologii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

1. Sposób przygotowania manuskryptu

1.1. Tekst

Prace należy przysyłać do Sekretariatu Redakcji w postaci elektronicznego zapisu tekstu w edytorze Microsoft Word dowolnej edycji w wersji PL na dyskietkach komputerowych (3,5" 1,44 MB), na płytach CD lub DVD. Do dyskietki powinny być dołączone 2 egz. tekstu artykułu całkowicie zgodnego z zapisem elektronicznym. Objętość pracy nie powinna przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 30 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być jednostronny (wielkość czcionki 12, odstęp pomiędzy wierszami 1,5), z numeracją stron. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Na oddzielnej stronie (strona tytułowa) należy podać tytuł pracy, pod nim w pełnym brzmieniu imiona i nazwiska autorów, adresy autorów i afiliacje, telefony oraz e-mail z zaznaczeniem autora korespondencyjnego, spis treści (tytuły poszczególnych rozdziałów) oraz kilka (nie więcej jak pięć) słów kluczowych (keywords). Tytuł pracy, spis treści i słowa kluczowe należy powtórzyć w języku angielskim. Słowa kluczowe mogą bądź nie pojawiać się w tytule pracy – należy je podać w porządku alfabetycznym. W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy” prace przygotowane wg. wyżej wymienionych wytycznych należy przesłać na adres Redaktora Działu. Praca powinna kończyć się krótkim podsumowaniem, zawierającym najistotniejsze elementy treści. Na oddzielnej stronie należy dołączyć krótkie streszczenie pracy w języku angielskim (maksymalnie 250 słów). Tekst pracy powinien być zgodny z zaleceniami szczegółowymi Redakcji.

Przesłane do redakcji prace winny być napisane poprawną polszczyzną. Redakcja rekomenduje P.T. Autorom **Słownik Poprawnej Polszczyzny** (red. Witold Doroszewski, Halina Kurkowska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1998) jako pomoc w redagowaniu tekstu. Jakkolwiek *Postępy Mikrobiologii* są polskojęzyczne, nie wyklucza się druku prac, napisanych w języku angielskim.

1.2. Ilustracje

Tabele i rysunki powinny być dostarczone w wersji elektronicznej oraz w formie wydruku z drukarki laserowej lub atramentowej. Maksymalne rozmiary rysunków planowanych w artykule w jednej szpalce nie powinny przekraczać 7,5 cm × 16 cm (szer./wys.), a zaplanowanych w obszarze dwóch szpalt 11 cm × 21 cm (szer./wys.). Szerokość planowanych tabel nie powinna przekraczać rozmiarów rysunków (odpowiednio 7,5 cm lub 11 cm), a ich wysokość nie powinna być większa od 10 cm, niezależnie od zaplanowanej szerokości tabeli.

W maszynopisach nie należy pozostawiać wolnych miejsc na rysunki i zdjęcia, a tylko na kopii zaznaczyć miejsce, w którym

powinny być umieszczone, np. tab. 1, rys. 1. Liczbę rysunków i tabel należy ograniczyć do istotnie niezbędnej ilości. Te same wskazówki odnoszą się do pojedynczych wzorów chemicznych. Każda tabela powinna być oznaczona kolejnym numerem rzymskim oraz mieć nagłówek opisujący jej treść. Na osobnej kartce należy załączyć spis z objaśnieniami jakie powinny się znaleźć pod rysunkami lub z uwagą „objaśnienia w tekście”. Podpisy pod wykresami, rysunkami, zdjęciami należy umieścić na osobnej stronie.

1.2.1. Elektroniczne wersje ilustracji

Pliki cyfrowe zawierające ilustracje akceptowane do druku należy przygotować zgodnie z zaleceniami Redakcji. Ilustracje we wstępnej wersji artykułu przeznaczonej dla recenzentów mogą być dostarczone jako pliki PDF, ale w wersji ostatecznej do druku muszą być dostarczone jako pliki TIFF albo EPS. Pliki pochodzące z programu Power Point akceptowane są jedynie w wersji ilustracji czarno białej. Wszystkie rysunki (oprócz czarno białych z programu Power Point) wyeksportowane do formatu bitmapy muszą być zachowane w skali szarości albo w systemie CMYK (ang. Cyan, Magenta, Yellow, black). Nie należy stosować zapisu w systemie RGB (ang. Red, Green, Blue). Obrazy stonowane (zróżnicowanie gęstości lub cienie) muszą być sporządzone w skali szarości (nie używać bitmapy). Pliki kolorowe sporządzone w programie Power Point nie są akceptowane z powodu różnic pomiędzy RGB i CMYK podczas wydruku.

Wszystkie grafiki należy przysyłać w 100% wymiarze bez konieczności skalowania. Minimalna rozdzielczość stosowana w ilustracjach powinna wynosić 300 dpi dla zdjęć szarych i kolorowych, 600 dpi dla liter i 1200 dpi dla linii w wykresach. Kolorowe ilustracje muszą pozostawać także w systemie CMYK jako obrazy CMYK TIFF o rozdzielczości 300 dpi.

Grafiki należy przysyłać w ich naturalnym planowanym formacie, aby nie istniała konieczność ich powiększania lub zmniejszania w Wydawnictwie. Wszystkie ostateczne napisy, oznaczenia czy też klucze oznaczeń muszą być wprowadzone do rysunków. Każdy rysunek musi być dołączony jako osobny plik, a rysunki wielo panelowe muszą być podane w jednym pliku. Aby uniknąć problemu z różnymi fontami Redakcja zaleca stosowanie następujących czcionek: Times New Roman, Times New Roman Pl, Arial, Arial Pl oraz Symbol. Dane są przyjmowane na standardowych mediach takich jak dyskietki (3,5 cala), płyty CD lub DVD. Przesłane dyski lub dyskietki nie będą zwracane autorom. Zalecaną przez redakcję kompresją informacji jest ZIP lub PKZIP (Windows). Redakcja nie akceptuje ilustracji wykonanych Microsoft Office, ponieważ są one zapisane w systemie RGB. Elementy rysowane, takie jak wykresy, formuły matematyczne czy diagramy nie powinny zawierać dodatkowych nanieśnięć ręcznych i powinny być łatwo odtwarzane w dostępnych programach. W celu szczegółowej informacji proszę wysyłać zapytanie przez e-mail na adres: jbielecki@biol.uw.edu.pl.

1.3. Piśmiennictwo

Cytowaną literaturę (Piśmiennictwo) należy wpisać oddzielnie jako ostatnie strony maszynopisu, wymieniając pozycje w kolejności alfabetycznej. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery

imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, strona, i rok wydania (w nawiasie), np.

Arendsen, A.F., M.Q. Solimar i S.W. Ragsdale. Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **181**, 1489–1495 (1999).

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

Portnoy D.A., Sun A.N., Bielecki J.E.: Escape from the phagosome and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* (w) *Microbial Adhesion and Invasion*, red. M. Hook, L. Świtalski, Springer Verlag, New York, 1991, s. 86.

W przypadku gdy liczba współautorów pracy przekracza 10, należy podać nazwiska i inicjały pierwszego oraz ostatniego współautora a następnie dodać uwagę i wsp., np.:

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

(wyżej cytowana praca jest dziełem 42 autorów)

Powolywanie się w tekście na pozycje cytowanej literatury następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach np. [10]. Liczba cytowań w piśmiennictwie nie może przekraczać 100 pozycji.

1.4. Piśmiennictwo danych cytowanych z sieci internetowej

Cytowanie danych z sieci internetowej może jedynie dotrzeć informacji pochodzących z prac oryginalnych zamieszczanych w sieci przez uznane w środowisku naukowym oraz recenzowane czasopisma. Redakcja będzie również uznawać cytacje informacji ze źródeł autoryzowanych przez uznane w środowisku autorytety z dziedziny nauk przyrodniczych. Warunkiem koniecznym przy użyciu informacji ze strony internetowej jest sprawdzenie i aktualizacja zapisu informacyjnego na stronie WEB w dniu wysyłania maszynopisu. W przypadku niewłaściwego adresu i niemożliwości odtworzenia informacji z sieci komputerowej, prace będą zwracane autorom. Cytowanie informacji publikowanej na stronach sieci internetowej powinno wyglądać następująco: 14. XYZ Website 14 listopada 2004 roku (online), nazwisko wydawcy, jeśli jest znane, <http://cbx.iou.pgr>. (10 Października 2004 roku, data ostatniego sprawdzenia adresu). Cytowanie książek powinno zawierać szczegółowe dane o wydawnictwie. Cytacje prac oryginalnych przesyłanych poprzez sieć komputerową powinna zawierać następujące dane: nazwisko autora, inicjały imion, data przyjęcia pracy, tytuł pracy. Nazwa czasopisma, numer: strony (jeśli są dostępne) (online), adres internetowy, data potwierdzenia ważności adresu.

2. Prawo autorskie

Autorskie prawo osobiste (Ustawa z dn. 4-tego lutego 1994 r., Dz.U. Nr 90, poz. 631 ze zm.), zwane dalej w **Informacji dla Autorów** prawem autorskim dotyczy niemajątkowych interesów twórcy związanych z danym utworem oraz określa zasady ochrony więzi twórcy z utworem. Do praw tych między innymi należy:

- prawo do autorstwa utworu – wyrażające m.in. zakaz „przywłaszczenia” utworu przez inne niż twórca osoby (zakaz dokonywania plagiatów)

- prawo do oznaczenia utworu swoim nazwiskiem albo udostępnienia utworu anonimowo
- prawo do nienaruszalności treści i formy utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

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

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

- Pod cytowanym rysunkiem należy w opisie podać nazwisko pierwotnego Autora, pełną bibliografię pracy z której pochodzi rysunek oraz informację o zgodzie Wydawnictwa lub Autora na jego reprodukcję.

- Cytowany tekst powinien być wyraźnie oznaczony w odpowiednim miejscu manuskryptu, zaś u dołu strony powinna być zamieszczona informacja dotycząca pochodzenia cytatu oraz uzyskanej zgody na przedruk.

(b) Dozwolone jest wprowadzanie zmian w cytowanych rysunkach innych Autorów/twórców pod warunkiem każdorazowego uzyskania ich zgody (lub osób upoważnionych przez nich) na dokonanie takich zmian. Zmiany w oryginalnych rysunkach mogą wynikać z chęci Autorów *P.M.* do dokonania nowego opracowania lub nowego przedstawienia omawianego przez siebie zagadnienia. W tych przypadkach wskazane jest, aby zgoda twórcy wskazywała na zakres dokonywanych zmian, gdyż pozwoli to uniknąć wątpliwości odnośnie zakresu wyrażonej tak zgody. Wreszcie konieczność uzyskania zgody pierwotnego Autora/twórcy na dokonanie zmian w reprodukowanym rysunku wynika z możliwości ingerencji Autorów *P.M.* w autorskie prawo osobiste w postaci nienaruszalności formy i treści utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

(c) Warunkiem przyjęcia przez Redakcję *P.M.* manuskryptu pracy oraz poddania jej dalszej procedurze wydawniczej jest złożenie wraz z manuskrytem Oświadczenia o oryginalności pracy, Oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz w przypadku prac metodycznych Oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów”.

3. Zalecenia szczegółowe*

3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów

Należy stosować dwuczłonowe nazwy zawierające nazwę rodzajową oraz gatunkową (np. *Escherichia coli*). Nazwy rodzajowe mogą być użyte same tj. bez nazwy gatunkowej, natomiast nie można użyć samych tylko nazw gatunkowych. Gdy w pracy podaje się pierwszy raz nazwę gatunku, musi ona składać się z pełnych wyrazów, przy ponownym użyciu tej nazwy, podaje się tylko pierwszą literę nazwy rodzajowej (zawsze dużą) oraz nazwę gatunkową w pełnym brzmieniu np. *E. coli*. Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa należy pisać kursywą. Informacje szczegółowe dotyczące pisowni oraz prawidłowego nazewnictwa (zgodnego z wymogami współczesnej sys-

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

tematyki) – przyjęte przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii*, za instrukcją **ASM** – można znaleźć w **Instructions to Authors**, *J. Bacteriol.*, Jan. 2007.

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

3.2. Nomenklatura genetyczna

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

(a) Fenotypowe określenie właściwości organizmu stosuje się gdy zmutowane loci nie zostały zidentyfikowane oraz zmapowane. Może być także użyte w przypadku, gdy identyfikuje się produkt genu np. białko OmpA. Zapis fenotypu zasadniczo składa się z trzech liter, nie można ich pisać kursywą, pierwsza litera powinna być zawsze dużą literą. Preferuje się użycie liczb rzymskich lub arabskich dla oznaczania bliźniaczych fenotypów np. Pol1, Pol2, Pol3 itd. Typ dziki można zapisać dodatkowym oznaczeniem *plus* (Pol+); w odróżnieniu do tego oznaczenie *minus* określać będzie fenotyp mutanta (Pol-). Czasami pewne charakterystyczne właściwości organizmu można zapisać używając liter np. (StrS).

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

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

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

(e) Zapis genotypu może być wzbogacony innymi oznaczeniami jak *plus*, dla typu dzikiego czy *minus* dla mutanta – można wprowadzić oznaczenia określające mutacje jak np. mutacja Amber (Am), mutant termowrażliwy (Ts), mutant konstytutywny (Con), mutant wrażliwy na niskie temperatury (Cs), białko hybrydowe (Hyb) np. *araA230*(Am), *his D21*(Ts). Wprowadza-

nie innych wzbogaceń powinno być poprzedzone w tekście odpowiednim wyjaśnieniem.

(f) Dodatkowe oznaczenia mogą też być użyte w przypadku konieczności rozróżnienia tego samego genu znajdującego się w różnych organizmach lub szczepach tego samego gatunku np. *his*_{*E.coli*} lub *his*_{*K-12*}. Dodatkowe oznaczenia stosuje się również dla rozróżnienia pomiędzy genetycznymi elementami o tej samej nazwie np. promotory operonu *gln*; *glnA1* i *glnA2*.

(g) Delecję oznacza się symbolem, D usytuowanym przed zdelecionowanym genem lub regionem np. D *trpA432*, D(*aroP-aceE*)419, lub D*his*(*dhuA hisJ hisQ*)1256. Fuzję genów *ara* i *lac* można przedstawić w ten sam sposób – F(*ara-lac*)1256. Podobnie F(*araB'-lacZ*)(Hyb) oznacza, że fuzja nastąpiła pomiędzy genami *araB* a *lacZ*. Inwersja jest oznaczana następująco IN(*rrnD-rrnE*)1. Insercję genu *his* *E. coli* do plazmidu pSC101 w pozycji 0 zasad (0kb) zapisuje się następująco pSC101 W (Okb::K-12*hisB*)4.

Oznaczenie obecności epizomu polega na podaniu jego symboli w nawiasie po nazwie szczepu rodzicielskiego np. W3110/F⁺ 8(*gal*⁺).

3.3. Skróty nazw chemicznych

Nie wymagają dodatkowych wyjaśnień skróty nazw, takich jak:

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

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

3.4. Pisownia danych numerycznych

Standardowe jednostki metryczne są stosowane dla określania długości, wagi i objętości. W przypadku przedstawiania tych wartości oraz molarności należy stosować przedrostki m, μ , n oraz p dla wartości 10–3, 10–6, 10–9 oraz 10–12. Temperaturę należy przedstawiać tylko w stopniach Celsjusza np. 37°C.

3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami

Jeśli wyznakowana jest pojedyncza cząsteczka w związku chemicznym należy nazwę tego związku zapisać w następujący sposób 14CO₂, 3H₂O, H₂35SO₄. Taki sam sposób zapisu stosuje się gdy radioaktywna cząsteczka nie występuje w naturalnej formie wyznakowanego związku np. 32S-ATP lub gdy symbol izotopu związany jest z niespecyficzną nazwą związku np. 14C aminokwasy, 3H-ligandy itp. W przypadku niektórych specyficznych związków chemicznych można stosować nawiasy kwadratowe obejmujące symbole radioaktywnej cząsteczki przed nazwą chemiczną związku np. [14C] mocznik, L-[metylo-14C] metionina, [g-32P] ATP.

4. Procedura recenzowania i przyjęcia prac

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

- Każda praca przesłana do Redakcji jest oceniana przez jednego ze stałych Recenzentów *P.M.* (lista Recenzentów, patrz Rada Redakcyjna jest również publikowana w każdym zeszycie *P.M.* oraz na stronie internetowej <http://www.pm.microbiology.pl>). W przypadku braku w Radzie Redakcyjnej *P.M.* Recenzenta o odpowiedniej specjalności lub jego braku z innych ważnych przyczyn, Redaktor naczelny powołuje Recenzenta spoza Rady Redakcyjnej.
- Recenzje są anonimowe oraz dokonywane na specjalnie do tego przygotowanych arkuszach
- Recenzenci nie otrzymują zapłaty od PTM za wykonaną pracę.
- Nazwiska Recenzentów z poza Rady Redakcyjnej są wraz z podziękowaniami publikowane w każdym 4-tym zeszycie *P.M.* odpowiedniego roku.
- W przypadku negatywnej oceny pracy przez Recenzenta oraz jego sugestii skierowanej do Redaktora naczelnego odrzucenia recenzowanej pracy, bądź jej znacznego przeredagowania, Autor *P.M.* ma prawo odwołania się od tej sugestii do Redaktora naczelnego. W opisywanym przypadku decyzją Redaktora powoływany jest dodatkowy Recenzent z poza Rady Redakcyjnej *P.M.*

5. Uwagi dodatkowe

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonywania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się autorowi jeden egzemplarz pracy oraz dyskietkę w celu dokonania poprawek. Adresy instytucji, w których pracują autorzy (adres pocztowy oraz e-mail) należy podawać w maszynopisie pracy po piśmiennictwie. Prace nie odpowiadające wymaganiom Redakcji będą odsyłane autorom bez rozpatrzenia merytorycznego. W razie nie przyjęcia pracy do druku Redakcja zwraca dyskietkę oraz jeden egzemplarz wydruku, drugi zatrzymuje u siebie. Za datę wpływu przyjmuje się dzień otrzymania pracy w formie zgodnej z instrukcją dla autorów. Autorzy otrzymują bezpłatnie 15 odbitek pracy. Za prace opublikowane w *Postęпах Mikrobiologii* nie przewiduje się honorariów autorskich. Prace należy nadsyłać na adres sekretarza naukowego redakcji:

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

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy” prace przeglądowe przygotowane zgodnie z wyżej wymienionymi zasadami należy przesłać na adres Redaktora Działu.

INFORMACJA DOTYCZĄCA PRAC DRUKOWANYCH W DZIALE PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

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

Redaktorem odpowiedzialnym za wartość merytoryczną, redakcję tekstu oraz ostateczne przyjęcie pracy do druku jest prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba (**adres: prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba – Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej. Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, tel/fax (091) 46 616 51, 52, fax (091)46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci.pam.szczecin.pl**)

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

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

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

Zalecenia dla Autorów :

1. Przesyłanie publikacji :

- Manuskrypt (w dwu egzemplarzach w formie papierowej oraz jednym egzemplarzu na nośniku elektronicznym wraz z rysunkami, tabelami itp.) proszę przysyłać bezpośrednio do Redaktora **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW**.
- Podając adres/y Autorów publikacji należy zaznaczyć Adtora korespondencyjnego – prócz adresu pocztowego, numeru telefonu i ew. faxu należy obowiązkowo podać adres *e-mail* Adtora korespondencyjnego.

2. **Sposób przygotowania manuskryptu** – Pracę należy opracować zgodnie z ogólnymi zaleceniami zawartymi w **INFORMACJI DLA AUTORÓW *Postępów Mikrobiologii*** (POST. MIKROB. 2009, 48, 1, Zeszyt 1) z uwzględnieniem następujących zmian:

- Objętość pracy nie może przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 20 stron maszynopisu.
- Ilość cytowań w rozdziale **Piśmiennictwo** nie powinna przekraczać 50 pozycji.
- W spisie cytowanego piśmiennictwa należy umieszczać wyłącznie prace drukowane w czasopiśmie naukowych, niedopuszczalne jest zamieszczanie danych bibliograficznych prospektów reklamowych lub promocyjnych firm farmaceutycznych.

3. **Prawa autorskie** – do każdej przygotowanej do druku publikacji załączyć **Oświadczenie dotyczące praw autorskich**. Wzór oświadczenia można pobrać ze strony internetowej *P.M.*

4. Zalecenia i uwagi dodatkowe:

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

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

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

Jerzy Długoński (Uniwersytet Łódzki)

Waleria Hryniewicz

(Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego)

Józef Kur (Politechnika Gdańska)

Anna Przondo-Mordarska

(Akademia Medyczna we Wrocławiu)

Oświadczenie o oryginalności pracy

.....
 Nazwisko i imię autora (korespondencyjnego)

.....
 Tytuł pracy

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

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

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

Warszawa, dnia

.....
 – podpis Autora korespondencyjnego –

[Wzór]

Oświadczenie dotyczące praw Autorskich

1.

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

Adres autorów:

Tytuł pracy:

2. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b)

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

.....
 (miejsce, data)

.....
 (podpis korespondencyjnego autora)

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

nr:, zamieszczonych w*:

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

nr:, zamieszczonych w:

(* podać bibliografie prac oryginalnych z których reprodukowane będą rysunki lub tabele)

Do Oświadczenia załączam oryginalne zezwolenia reprodukcji w liczbie:

rysunków: tabel: cytowanego tekstu:

.....
 (miejsce, data)

.....
 (podpis korespondencyjnego autora)

**Oświadczenie
dotyczące „konfliktu interesów”¹**

1. Nazwisko i imię autora:

2. Tytuł pracy:

.....

.....

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

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

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

.....

.....

(miejsce, data)

.....

(podpis korespondencyjnego autora)

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

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

Uprzejmie informujemy PT Autorów *PM*, że zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów z dnia 6 lutego 2007 roku wprowadzono zasady płatności za prace przyjmowane do druku w naszym piśmie. Autorzy manuskryptów proszeni są o wnoszenie opłat w wysokości 250 PLN za każdy artykuł na **konto Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów:**

Bank Pekao S.A. 18 1240 5992 1111 0000 4774 7434.

Opłatę można wносить indywidualnie. W tym przypadku dowód wpłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. W imieniu Autorów opłatę może wносить sponsorująca instytucja, fundacja itp. Wtedy Autorzy zobowiązani są do złożenia w Redakcji wraz z manuskrytem pisemnego zobowiązania się do bezzwłocznej opłaty za publikację po otrzymaniu faktury VAT. Należy dodatkowo:

- **Przesyłać zgłoszenia** proponowanych do publikacji artykułów wraz z danymi do wystawienia faktury VAT (NIP, nazwa i adres instytucji lub osoby fizycznej) na nr faksem (022) 841-29 49, lub drogą pocztową **na adres siedziby Zarządu PTM:** 00-725 Warszawa ul. Chełmska 30/34.
- Do dowodu wpłaty lub zobowiązania zapłaty **dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko autora korespondencyjnego.**

Otrzymanie przez Redakcję pracy wraz z kopią potwierdzenia wpłaty lub zobowiązaniem zapłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej.

W przypadku nie przyjęcia przez Redakcję do druku pracy zwrot opłaty wraz z korektą faktury dokonany będzie przez księgowość PTM.

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW PRAC PUBLIKOWANYCH W SUPLEMENTACH DO KWARTALNIKA POSTĘPY MIKROBIOLOGII

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

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

W suplementach nie będą publikowane oryginalne prace doświadczalne prezentowane na ww. Zjazdach naukowych. Prace te po odpowiednim przygotowaniu, zgodnie z instrukcją dla autorów, można przysyłać do Redakcji *Polish Journal of Microbiology (Acta Microbiologica Polonica)* lub innego czasopisma naukowego.

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

Oferta Reklamy

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

Pismo nasze dociera co kwartał do kilku tysięcy odbiorców. Są wśród nich specjaliści różnych dziedzin mikrobiologii, pracujący jako nauczyciele wyższych uczelni, szkół średnich oraz pracownicy naukowcy instytutów badawczych, biotechnologów oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

Cena ogłoszenia czarno-białego wewnątrz numeru wynosi:

1/2 strony 250,- zł

cała strona 500,- zł

Proponujemy również ogłoszenia kolorowe – cena do uzgodnienia.

Teksty opracowanych graficznie reklam proszę składać na adres Redakcji *Postępów Mikrobiologii*, 02-007 Warszawa, ul. Oczerki 3, tel. 628 08 22.

Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń

Uprzejmie informujemy PT Czytelników, że od września 2008 roku na stronie internetowej *Postępów Mikrobiologii* działa wyszukiwarka. Umożliwia ona odnajdywanie informacji zarówno w bieżących jak i archiwalnych zeszytach naszego pisma.

Redakcja i Administrator Strony Internetowej

INFORMACJA

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów uprzejmie informuje, iż zgodnie z Uchwałą Walnego Zgromadzenia Delegatów z dnia 4.09.2008 r. **od dnia 01.01.2009 r.** ulega zmianie wysokość składki członkowskiej.

- Wysokość składki członkowskiej od 2009 roku wynosi **80 zł/rok**,
- Wysokość składki dla członków **Emerytów – 40 zł/rok**

Z opłacania składki członkowskiej zwolnieni są Członkowie Honorowi Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

SKŁADKI PROSIMY OPŁACAĆ DO KOŃCA I KWARTAŁU KAŻDEGO ROKU KALENDARZOWEGO

CZASOPISMA

- W ramach składki otrzymają Państwo kwartalnik *Postępy Mikrobiologii* lub *Polish Journal of Microbiology* (prosimy o podanie wybranego czasopisma przy opłacaniu składki członkowskiej)
- Istnieje możliwość rocznej prenumeraty drugiego kwartalnika koszt 40 zł/rok (dla członków PTM).

Informujemy, iż od dnia 01.01.2009 roku uległ zmianie numer konta PTM.

Od 01.01.2009 r. składki członkowskie należy wpłacać na konto:

Nazwa posiadacza rachunku:

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

Bank i numer konta:

Bank Pekao S.A. **18 1240 5992 1111 0000 4774 7434**

Spis treści

Wspomnienie o profesorze Lesławie Arnoldzie Jakubie Badurze (7.04.1925–21.12.2008)	3
K. Szymanek, A. Młynarczyk, G. Młynarczyk – Systemy regulacyjne ekspresji genów u <i>Staphylococcus aureus</i>	7
A. Jaworski, A. Dobrowolska – System interferencyjnego RNA bakterii (CRISPR-CAS) i jego rola w obronie przed infekcją fagową	23
E. Karczewska, I. Wojtas, A. Budak – Występowanie pierwotnej oporności <i>Helicobacter pylori</i> na leki przeciwbakteryjne w Polsce i na świecie	31
K. Guz, W. Doroszkiewicz – Biologia, ekologia i chorobotwórczość pałeczek z rodzaju <i>Bartonella</i>	43
T. Wołkowicz, M. Kadłubowski, E.K. Jagusztyn-Krynicka, W. Hryniewicz – Mechanizmy oporności <i>Haemophilus influenzae</i> na antybiotyki β -laktamowe	55
M. Więckowicz – Molekularne metody identyfikacji mikroorganizmów w złożonych ekosystemach	67

Contents

Professor Lesław Arnold Jakub Badura (7.04.1925–21.12.2008)	3
K. Szymanek, A. Młynarczyk, G. Młynarczyk – Regulatory systems of gene expression in <i>Staphylococcus aureus</i>	7
A. Jaworski, A. Dobrowolska – Organization of the bacterial interference RNAi-like system (CRISPR-CAS) and its role against bacteriophages	23
E. Karczewska, I. Wojtas, A. Budak – Prevalence of <i>Helicobacter pylori</i> primary resistance to antimicrobial agents in Poland and around the world	31
K. Guz, W. Doroszkiewicz – Biology, ecology and pathogenicity of rods of the <i>Bartonella</i> genus	43
T. Wołkowicz, M. Kadłubowski, E.K. Jagusztyn-Krynicka, W. Hryniewicz – Mechanisms of resistance of <i>Haemophilus influenzae</i> to β -lactam antibiotics	55
M. Więckowicz – Molecular methods for the identification of microorganisms in complex communities	67

ERRATA:

W abstrakcie artykułu „Profesor Rudolf Stefan Weigl (1883–1957)”,
który ukazał się w zeszycie 4/2008 *Postępów Mikrobiologii*
na stronie 511 powinno być w wierszu 4 od góry: Typhus Institute.