

Kwartalnik

Tom 48

Zeszyt 3 • 2009

CODEN:

PMKMAV 48 (3)

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 (Warszawski Uniwersytet Medyczny),
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 POMOCA 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 8 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



Profesor Stefan Kryński
(1 VIII 1914 – 13 IV 2009)

Profesor Akademii Medycznej w Gdańsku, nestor mikrobiologii polskiej, wybitny pedagog, uczeń Prof. Rudolfa Weigla, absolwent Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Poznańskiego, uczestnik kampanii wrześniowej, lekarz w Oddziale Lecha i I Batalionie 34 pułku piechoty Armii Krajowej. Doktorat, którego promotorem był prof. Rudolf Weigl, obronił na Uniwersytecie Jagiellońskim w kwietniu 1946 roku. W latach 1944–1946 kierował Zakładem Produkcji Szczepionki przeciw Durowi Plamistemu w Lublinie. W listopadzie 1946 roku z prof. Jerzym Morzyckim organizował Zakład Mikrobiologii Akademii Lekar-

skiej w Gdańsku. Od października 1954 roku pełnił funkcję Kierownika Zakładu Mikrobiologii i Dyrektor Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej. Katedrą kierował przez 30 lat, do 1984 roku.

Wyrazem uznania pozycji Prof. Stefana Kryńskiego w dziedzinie badań nad zakażeniami gronkowcowymi było powołanie Jego w 1964 roku na Członka International Subcommittee for Staphylococcus Phage Typing w Londynie. Był członkiem Komitetu Mikrobiologicznego PAN, Société Française de Microbiologie, Krajowego Zespołu Specjalistów, członkiem honorowym Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów i Polskiego Towarzystwa Lekarskiego a także członkiem Światowego Związku Żołnierzy AK.

Za osiągnięcia naukowe prof. Stefan Kryński otrzymał trzykrotnie Indywidualną Nagrodę I Stopnia Ministra Zdrowia, Nagrodę Wojewody Gdańskiego i dwie nagrody Rektora AMG. Uhonorowany został między innymi: Złotym Krzyżem Zasługi, Za Wzorową Pracę w Służbie Zdrowia, Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, Za Zasługi dla Gdańska, Zasłużonemu Akademii Medycznej w Gdańsku, Zasłużony Nauczyciel, Medalem 40-Lecia PRL i Medalem Edukacji Narodowej.

Profesor wykształcił kilka pokoleń polskich mikrobiologów. Wypromował dwudziestu dwóch doktorów. W kierowanej przez Profesora Katedrze wykonano cztery habilitacje a sześciu Jego uczniów uzyskało tytuł profesora. Uważał, że naukowiec powinien zajmować się nie tylko pracą badawczą, lecz także organizacją nauki i jej upowszechnianiem. To posłannictwo realizował w całym swoim życiu.

Pogrzeb Profesora Stefana Kryńskiego odbył się 18 kwietnia w Łomazach.



**13 kwietnia 2009 roku zmarł Prof. zw. n. med.
Stefan Kryński**

Profesor Stefan Kryński urodził się 1 sierpnia 1914 roku w Wilnie. Był synem lekarza wojskowego i nauczycielki. Jego życiorys odzwierciedla losy wielu Polaków tego pokolenia. W swoim życiu przeżył rewolucję bolszewicką, dwie wojny, rządy komunistyczne i doczekał się wolnej III Rzeczypospolitej Polski.

W 1918 roku powrócił z Rosji ostatnim transportem do Polski. Okres szkolny i studia spędził wraz z rodziną w Poznaniu, gdzie ukończył gimnazjum im. dr Karola Marcinkowskiego i uzyskał świadectwo dojrzałości w maju 1932 roku. W latach 1932–1937 studiował na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Poznańskiego i pracował jako asystent wolontariusz w Oddziale Higieny Ogólnej i Medycyny Społecznej Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Poznańskiego.

Po uzyskaniu dyplomu lekarza, w kwietniu 1938 roku, odbył obowiązkowy staż w Szpitalu Okręgowym Nr VII w Poznaniu a następnie służbę wojskową w Szkole Podchorążych Sanitarnych Rezerwy w Warszawie. Pod koniec służby został przydzielony do Instytutu Chirurgii Urazowej a w lipcu 1939 roku był lekarzem Legii Akademickiej w II batalionie Junackich Hufców Pracy.

Wybuch II wojny światowej zastał Profesora w czasie pełnienia służby wojskowej we Włodzimierzu Wołyńskim. Słowa Pana Profesora, pisane we wspomnieniach po latach, oddają tragizm tamtego okresu „...Czy jednak dziś ktoś zrozumie rozpacz dwudziestopięcioletniego podchorążego, tułającego się po kraju, nie mogącego pomóc ginącej ojczyźnie, patrzącego na ruiny

swoich ideałów? Dziś Ojczyzna to pusty dźwięk, to frazes z książki, a dla nas, w tamtych dniach, to było coś wielkiego i bardzo drogiego, coś, co nam zabrano i sporniewierano, coś, dla czego się ginęło na polu walki i dla czego niektórzy, w chwili jej upadku, z rozpaczą odbierali sobie życie...czym może być uczestnictwo w tragedii Narodu. ...w tych tragicznych dniach młodzieniec przemienił się w mężczyznę i nauczył się rozumieć, że w świecie istnieją większe dobra niż osobiste szczęście i że człowiek jest odpowiedzialny nie tylko za siebie”.

Po wkroczeniu wojsk radzieckich przedostał się do Lwowa. Tutaj, od czerwca 1940 do końca marca 1944 roku, pracował początkowo przy produkcji szczepionki a następnie jako asystent, w Instytucie Badań nad Durem Plamistym i Wirusami we Lwowie, u prof. Rudolfa Weigla. W marcu 1942 roku został kierownikiem pracowni doświadczalnej, gdzie prowadził badania naukowe bezpośrednio pod opieką prof. R. Weigla. W Instytucie przygotował pracę doktorską „Badania nad toksycznym działaniem zaradka duru plamistego *Rickettsia prowazeki*”, której promocja odbyła się dopiero po wojnie, w kwietniu 1946 roku, na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego.

„To był szczęśliwy los” mówił zawsze Profesor, „że zostałem uczniem wielkiego polskiego uczonego”. Profesor Rudolf Weigl, wynalazca szczepionki przeciwko durowi plamistemu, był ogromnym autorytetem dla młodego lekarza-naukowca, którego utwierdził w przekonaniu, że „dla uczonego nauka powinna być celem i sensem życia, jego prawdziwą, wielką miłością a nie tylko drogą do efektownej kariery, wysokiej pozycji społecznej, stanowisk i tytułów”. Tą zasadą kierował się przez całe swoje życie.

Znajomość z prof. Rudolfem Weiglem, która przetrwała się w przyjaźń, przetrwała trudne lata powojenne i kiedy prof. R. Weigl popadł w niełaszkę komunistycznych władz i środowiska naukowego, prof. Stefan Kryński walczył o przywrócenie dobrego imienia swojego wielkiego nauczyciela. Przekazał Muzeum Narodowemu Ziemi Przemyskiej własne zbiory, dotyczące pracy naukowej prof. R. Weigla, wyposażenie laboratorium, fotografie i gazety z artykułami o wielkim naukowcu.

W marcu 1944 roku, po likwidacji Instytutu, wyjechał do Białej Podlaskiej, gdzie podjął pracę jako lekarz w Przychodni Przeciwgruźliczej Ubezpieczeń Społecznych. Wobec szybko zbliżającego się frontu, zaangażował się w stworzenie służby medycznej lubelskiego oddziału Armii Krajowej. Jako lekarz 34 pułku piechoty AK uczestniczył w akcji „Burza” w powiecie bialsko-podlaskim.

W grudniu 1944 roku przyjął propozycję Naczelnego Nadzwyczajnego Komisarjatu do Walki z Epidemiami zorganizowania i kierowania Zakładem Produkcji Szczepionki przeciw Durowi Plamistemu im. Prof. R. Weigla w Lublinie. Na przełomie lutego i marca 1945 roku, otrzymano pierwsze szczepionki ze szczepów wyhodowanych od chorych na dur plamisty. Za organizację Zakładu i wysoki poziom produkcji szczepionki został odznaczony Złotym Krzyżem Zasługi. Na stanowisku kierownika Zakładu Produkcji Szczepionki pozostał do września 1946 roku, do likwidacji Zakładu.

Późniejsze losy związały na stałe Profesora z Gdańskiem i gdańską Akademią Medyczną, w której pracował, przechodząc kolejne szczeble kariery naukowej.

Od października 1946 roku razem z prof. Jerzym Morzyckim i prof. E.A. Symem organizował od podstaw Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, tworząc pracownie naukowe, szkoląc personel dydaktyczny i techniczny oraz prowadząc równoległe badania naukowe.

Zatrudniony najpierw na stanowisku starszego asystenta a następnie adiunkta, habilitował się w maju 1951 roku na podstawie rozprawy pt: „Badania nad działaniem barwników na *Rickettsia prowazeki*”, która została zatwierdzona w grudniu 1951 roku. W październiku 1954 roku Stefan Kryński uzyskuje tytuł naukowy profesora nadzwyczajnego a w marcu 1972 roku nadany zostaje tytuł profesora zwyczajnego nauk medycznych.

Wielki sukces penicyliny skłonił mikrobiologów i biochemików do poszukiwania nowych antybiotyków. W 1948 roku Stefan Kryński razem z Albinem Kuchtą wyizolował biologicznie czynną laseczkę *Bacillus pumilis*, co przyczyniło się do rozpoczęcia prac nad produkcją antybiotyku tetainy, które zostały zakończone sukcesem jego współpracowników, Edwarda i Jerzego Borowskich oraz Włodzimierza Kędzi.

Za wielki wkład i zaangażowanie w te badania Stefan Kryński otrzymał odznakę „Zasłużony Pracownik Służby Zdrowia” w 1951 roku.

Po przedwczesnej śmierci prof. Jerzego Morzyckiego, w październiku 1954 roku, Prof. S. Kryński został powołany na stanowisko Kierownika Katedry Mikrobiologii i Dyrektora Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej.

Profesor, w działalności naukowej do 1951 roku, zajmował się głównie *Rickettsia prowazeki* i biologią wszy odzieżowej. Ważnym osiągnięciem było wykazanie między innymi, że *Rickettsia prowazeki* wytwarza w organizmie przenosiciela toksynę, będącą czynnikiem inwazyjnym. W późniejszym okresie badania prowadził przede wszystkim nad gronkowcami i ich bakteriofagami oraz zakażeniami szpitalnymi. W zakresie tych zagadnień był uznanym autorytetem. Wyniki Jego badań nad gronkowcami i zakażeniami wewnątrzszpitalnymi

miały nowatorski charakter i przyczyniły się do lepszego poznania epidemiologii środowisk szpitalnych. Miały także aspekt praktyczny, gdyż w znacznym stopniu dzięki nim zaczęto wprowadzać w oddziałach noworodkowych system izolacji grupowej. To prof. Stefan Kryński z prof. Ireneuszem Roszkowskim wprowadzili zmodyfikowany system „*rooming in*” z systemu „*cohort isolation*” w II Klinice Położnictwa i Chorób Kobięcych. System ten później zastosowano w Grecji.

Wyrazem pozycji Stefana Kryńskiego w dziedzinie badań nad gronkowcami i zakażeniami szpitalnymi była nominacja Pana Profesora na członka International Subcommittee for Staphylococcus Phage Typing w Londynie w 1964 roku i utworzenie przy Katedrze Mikrobiologii Krajowego Ośrodka Typowania Gronkowców Bakteriofagami.

Profesor w ramach współpracy międzynarodowej, z tytułu prowadzenia Krajowego Ośrodka Typowania Gronkowców Bakteriofagami, brał udział w opracowywaniu metody typowania i ich standaryzacji.

Współpraca z prof. Mallaret z Instytutu Pasteura w Paryżu nad właściwościami biologicznymi *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* u stawonogów oraz udział Profesora w I Międzynarodowym Sympozjum Pseudotuberkulozy w Paryżu, pozwoliły na wprowadzenie w Polsce diagnostyki gruźlicy rzekomej. Wspólnie z prof. Romualdem Sztabą opisał pierwsze przypadki zakażeń węzłów chłonnych u dzieci, wywołane przez *Yersinia pseudotuberculosis*.

Za swoje osiągnięcia naukowe Profesor trzykrotnie otrzymał Indywidualną Nagrodę I Stopnia Ministra Zdrowia (1953 r., 1965 r. i 1984 r.), Nagrodę Wojewody Gdańskiego (1974 r.) oraz dwie Nagrody Rektora AMG II stopnia (1964 r. i 1969 r.).

Profesor Stefan Kryński w swoim bogatym dorobku naukowym, opublikował 160 prac naukowo-badawczych, artykułów popularno-naukowych i rozpraw w czasopismach krajowych i zagranicznych (w języku francuskim i angielskim) oraz był współautorem podręcznika. Profesor pisał także artykuły publicystyczne do *Polityki*, *Służby Zdrowia*, *Głosu Podlasia* i *Gazetki AMG*. W kierowanej przez Profesora Katedrze Mikrobiologii Lekarskiej przeprowadzono 22 przewody doktorskie i cztery habilitacje, a sześciu Jego uczniów zostało profesorami.

Profesor Stefan Kryński był dwukrotnie na stypendium Światowej Organizacji Zdrowia w Instytucie Pasteura w Paryżu (1959 r. i 1961 r.) i szkoleniu w Central Public Health Laboratory w Londynie (1966 r.). Brał udział w sympozjach międzynarodowych: Sympozjum Antybiotycznym – Praga (1964 r.), Collegium Bakteriofagowym – Wernigerode (1964 r.), I Międzynarodowym Sympozjum Pseudotuberkulozy – Paryż (1967 r.), International Symposium on the Control of Lice and Louse-borne Diseases – Waszyngton

(1972 r.), XI Konferencji Taksonomii Bakterii – Brno (1974 r.) i VI International Colloquium on Phage Typing and other Laboratory Methods of Epidemiologica – Wernigerode (1975 r.)

Pan Profesor był członkiem wielu towarzystw naukowych: Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, członkiem – założycielem Polskiego Towarzystwa Parazytologów, Polskiego Towarzystwa Entomologicznego, Komitetu Mikrobiologicznego PAN, Societé Francaise de Microbiologie, International Subcommittee for Staphylococcus Phage Typing, Gdańskiego Towarzystwa Naukowego, Krajowego Zespołu Specjalistów. W Polskim Towarzystwie Mikrobiologów pełnił funkcję Wiceprzewodniczącego Zarządu Głównego (1967–1971 r.) i przez wiele lat Przewodniczącego Oddziału Gdańskiego (1954–1967 r.)

Za jedno z ważniejszych zadań, w latach siedemdziesiątych, jakie postawił przed sobą Profesor była reorganizacja i organizacja 50 laboratoriów diagnostyki bakteriologicznej oraz nawiązanie współpracy z Klinikami. Na szczególne podkreślenie zasługuje wielki wkład, jaki wniósł w rozwój diagnostyki bakteriologicznej w województwach: gdańskim, elbląskim, toruńskim, słupskim, koszalińskim, bydgoskim i białsko-podlaskim, gdzie pełnił funkcję Konsultanta. W okresie 1982–1991 był członkiem Krajowego Zespołu Specjalistów i będąc już na emeryturze pełnił jeszcze funkcję Konsultanta Wojewódzkiego w woj. elbląskim. Pod kierunkiem Profesora 71 osób uzyskało specjalizację w zakresie mikrobiologii i wiele pracowni bakteriologicznych jest prowadzonych przez uczniów Pana Profesora.

W uznaniu zasług Profesor Stefan Kryński był uhonorowany wieloma odznaczeniami państwowymi i resortowymi: Złotym Krzyżem Zasługi (1946 r.), odznaką Za Wzorową Pracę w Służbie Zdrowia (1952 r.), Medalem 10-Lecia PRL (1955 r.), Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski (1973 r.), odznaką Za Zasługi dla Gdańska (1973 r.), odznaką Zasłużonemu Akademii Medycznej w Gdańsku (1975 r.), Zasłużony Nauczyciel (1984 r.), Medalem 40-Lecia PRL (1984 r.), Medalem Komisji Edukacji Narodowej (1986 r.), Odznaką za Zasługi dla województwa Elbląskiego (1986 r.) i Odznaką za Zasługi dla Województwa Białsko-Podlaskiego (1988 r.). Otrzymał również Białą Nagrodę Kultury im. Anny z Sanguszków Radziwiłłowej (2003 r.), za pielęgnowanie związków z ziemią ojców i wzbogacenie zbiorów regionalnych Muzeum Południowego Podlasia w Białej-Podlaskiej, do której miał szczególny sentyment.

Kiedy człowiek odchodzi od nas na zawsze, zadajemy sobie pytanie: jakim był, jaki pozostanie w naszej pamięci?

W pamięci tych, którzy stykali się na co dzień z Profesorem, zapisał się jako człowiek szlachetny, życzliwy innym, mający duże poczucie humoru. Z natury był człowiekiem pogodnym, ale nie była mu obca zmienność nastrojów. Miał dystans do osób nadmiernie celebrujących swoją ważność i często z takich sytuacji żartował. Nie lubił publicznych wystąpień. Wyjątek stanowiły, cieszące się wielkim powodzeniem wykłady dla studentów, które okraszał licznymi anegdotami i dowcipami, dzięki czemu potrafił zainteresować swoich słuchaczy nawet trudnymi tematami. Miał opinię wspaniałego pedagoga. Profesor był w szerokim rozumieniu tego słowa humanistą i erudytą. Szczególnie pasjonowała Jego historia, na której temat lubił prowadzić długie dyskusje. Na pewno miał wielki talent literacki, o czym mogli przekonać się wszyscy, czytając Jego wspomnienia, oparte na pamiętnikach, które prowadził przez większą część życia. Były one publikowane w *Gazecie AMG*, później wydane w postaci książkowej: „Kartki ze wspomnień starego profesora”. Charakter Profesora a także Jego życiorys wykształciły rzadko dziś spotykaną postawę wobec życia. Nie zabiegał o gromadzenie fortuny, nie miał wielkich wymagań a satysfakcję znajdował w pracy naukowej, kształceniu młodzieży i pracy dla chorych. Do końca interesował się losami Zakładu, któremu oddał swoją całą młodość, energię i serce. Pozostawił nam w spadku owoce swojej pracy a przede wszystkim ludzi, których wykształcił.

Pan Profesor Stefan Kryński zmarł 13 kwietnia, w Wielkanocny Poniedziałek 2009 roku. Odszedł od nas wielki polski mikrobiolog, autorytet naukowy, wybitna osobowość medycyny polskiej i gdańskiej, nauczyciel wielu pokoleń kadry medycznej i specjalistów w zakresie mikrobiologii. Miał 95 lat, był najstarszym Profesorem naszej Uczelni, który tak długo, aktywnie służył swoim bogatym doświadczeniem i mądrością. Profesor Stefan Kryński wskazał wielu osobom drogę życia zawodowego.

Pan Profesor Stefan Kryński został pochowany 18 kwietnia 2009 roku, w rodzinnym grobowcu Kryńskich i Barwińskich na cmentarzu parafialnym w Łomazach. Pana Profesora pożegnała Rodzina, przyjaciele, wychowankowie i znajomi.

Na zawsze pozostanie w naszej pamięci...

*Maria Dąbrowska-Szponar,
Janusz Galiński, Iwona Szychlińska*

Gdański Uniwersytet Medyczny
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
80-227 Gdańsk, ul. Do Studzienki 38
mikrob@amg.gda.pl
mszponar@amg.gda.pl

Maciej Czerkies, Adrianna Raczkowska, Katarzyna Brzostek*

Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii,
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło we wrześniu 2009 r.

1. Wstęp. 2. Enteropatogenne gatunki z rodzaju *Yersinia*. 3. *Y. pestis* – epidemiologia i patogenezę. 4. Czynniki zjadliwości *Y. pestis* kodowane na chromosomie. 5. Czynniki wirulencji kodowane na plazmidach: pCD1, pPCP1 oraz pMT1. 6. Struktura genomu *Y. pestis*. Inne elementy mające wpływ na patogenność. 7. Badania nad pokrewieństwem ewolucyjnym patogennych gatunków z rodzaju *Yersinia*. 8. Relacje wewnątrzgatunkowe i taksonomia *Y. pestis*. 9. Zastosowanie filogenomiki porównawczej do badania ewolucji *Y. enterocolitica*. 10. Proponowany model ewolucji patogennych gatunków z rodzaju *Yersinia*. 11. Podsumowanie

Quo vadis *Yersinia pestis*? The evolution of pathogenic species of the genus *Yersinia*

Abstract: The genus *Yersinia* includes three closely related species which are pathogenic to humans. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* cause gastroenteritis, while *Y. pestis* is the causative agent of plague. Thanks to whole-genome sequencing it has become possible to conduct a detailed phylogenetic analysis leading to the construction of a „relationship tree” which shows the probable evolution of the genus *Yersinia*. It appears that *Y. enterocolitica* has diverged from an ancestor of pathogenic yersiniae and evolved independently. *Y. pestis*, a highly virulent pathogen, evolved from *Y. pseudotuberculosis* in a short amount of time by the acquisition of several loci and two plasmids by lateral gene transfer. These events seem to be counterbalanced by gene silencing and shuffling, which probably enhances virulence.

1. Introduction. 2. Enteropathogenic species of *Yersinia*. 3. *Y. pestis* – epidemiology and pathogenesis. 4. Chromosomally encoded virulence factors of *Y. pestis*. 5. Plasmids pCD1, pPCP1 and pMT1 encoding virulence factors. 6. Genome structure of *Y. pestis*. Other elements influencing pathogenicity. 7. Studies on evolutionary relationships of yersinia. 8. Intraspecies relationships and taxonomy of *Y. pestis*. 9. Application of comparative genomics to study the evolution of *Y. enterocolitica*. 3. Model of the evolution of pathogenic yersinia. 4. Summary

Słowa kluczowe: dżuma, ewolucja, genomika, patogenezę, *Yersinia*

Key words: evolution, genomics, pathogenesis, plague, *Yersinia*

1. Wstęp

Do rodzaju *Yersinia* zaliczamy obecnie 15 gatunków: *Y. aleksiciae*, *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederikseni*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. philomiragia*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. similis* (www.bacterio.cict.fr/xz/yersinias.html). Rodzaj *Yersinia* został wyodrębniony w ramach rodziny *Enterobacteriaceae* w 1964 roku przez Wilhelma F r e d e r i k s e n a, który zaliczył do niego trzy gatunki patogenne dla ssaków, w tym ludzi, tj. *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica*, wcześniej klasyfikowane do rodzaju *Pasteurella*.

Gatunki te stały się obiektem szczegółowych badań dotyczących ich ekologii, epidemiologii, mechanizmów patogenezę oraz filogenezy. Od momentu przeklasyfikowania tych trzech gatunków w jeden rodzaj *Yersinia*, próbowano ustalić stopień pokrewieństwa pomiędzy nimi. Problem dotyczył zwłaszcza relacji między bakteriami enteropatogennymi, tj. *Y. pseudotuberculosis*

i *Y. enterocolitica*, a znacznie groźniejszym gatunkiem *Y. pestis*, wywołującym dżumę. W latach siedemdziesiątych do badań porównawczych użyto metody hybrydyzacji DNA, polegającej na ocenie stabilności temperatury zhybrydowanych próbek zdenaturowanego DNA porównywanych organizmów. Otrzymane wyniki, poddane analizie filogenetycznej, wskazały na znacznie bliższe niż się spodziewano pokrewieństwo pomiędzy *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*. Stopień homologii DNA-DNA wyniósł ponad 90% [5] i był znacznie niższy w stosunku do trzeciego badanego gatunku – *Y. enterocolitica*, który wyniósł zaledwie 48%. Co więcej, badania wykazały, że sekwencje 16S rRNA *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* są identyczne [44].

Według obowiązujących zasad klasyfikacji, większość szczepów *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* można zaklasyfikować do jednego gatunku lub obecnie obowiązujące taksony przeklasyfikować do rang podgatunków nowo określonego taksonu (spełnione są wymagania dotyczące podobnej zawartości par GC, 70% homologii DNA i 97% homologii sekwencji 16S

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kbrzostek@biol.uw.edu.pl

rRNA). Ze względu jednak na wyraźnie odróżnialne fenotypy obu gatunków oraz ogromne różnice w zakresie wywoływanych chorób, a także podłoże historyczne i epidemiologiczne, reklasyfikacji nie dokonano. Spowodowało to jednak ożywienie dyskusji na temat aktualnych zasad wyodrębniania gatunku jako taksonu oraz opracowania bardziej uniwersalnej definicji gatunku. Zwrócono uwagę, że obecne normy określania gatunku stosowane dla *Eukarya*, u bakterii wskazują na ekotypy, a nazwane gatunki odpowiadają rangą eukariotycznym rodzajom [11]. W celu uporządkowania systematyki zaproponowano m. in. włączenie pojęcia „klonu” do bakteryjnej systematyki [31].

W większości opracowań dotyczących ewolucji *Yersinia* pojawia się termin mikroewolucja, który używany bywa w stosunku do modyfikacji puli genowych populacji prowadzących do stosunkowo niewielkich zmian organizmów, ale nie kończących się specjacją, do której prowadzi tzw. makroewolucja [1]. Terminy te (tj. mikro- i makroewolucja), wprowadzone w 1927 roku, są obecnie używane bardzo niekonsekwentnie, a zasadność takiego rozróżnienia jest przedmiotem licznych dyskusji. Zagadnienie jest ponadto komplikowane, wspomnianym wyżej, brakiem ogólnie akceptowanej definicji gatunku, a więc także i specjacji. W przypadku *Yersinia* termin mikroewolucja używany jest by zaznaczyć istotną rolę horyzontalnego transferu genów (jednego z głównych mechanizmów mikroewolucji, obok mutacji i dryfu genetycznego) w ewolucji zachodzącej w obrębie tego rodzaju, a także podkreślić, że wyodrębnienie w systematyce *Y. pestis* jako gatunku ma właśnie charakter czysto formalny.

Wprowadzenie w ostatnich latach nowych metod badawczych, a także zsekwencjonowanie genomów *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* pozwoliło na zebranie danych dotyczących czynników zjadliwości, filogenetycznego pokrewieństwa oraz domniemanych czasów specjacji tych patogennych gatunków. W pracy przedstawiono wyniki badań nad ewolucją *Y. pestis* w świetle ostatnich badań, wzbogaconych o analizę genomowego DNA. Wyniki sekwencjonowania genomu dwóch szczepów *Y. pestis*, tj. KIM (biotyp *Mediaevalis*) oraz CO92 (*Orientalis*) zostały opublikowane [14, 37] natomiast genomu szczepu 8081 *Y. enterocolitica* http://www.sanger.ac.uk/Projekts/Y_enterocolitica/ oraz IP32953 *Y. pseudotuberculosis* (<http://bbrp.llnl.gov/ggrp/html/microbe.html>) są dostępne w wersji elektronicznej.

2. Enteropatogenne gatunki *Yersinia*

Y. pseudotuberculosis i *Y. enterocolitica* są gatunkami szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie. Występują w glebie i wodzie, a za główny rezerwuar tych

drobnoustrojów uważane są świnię. Oba gatunki są chorobotwórcze dla ludzi. Do zakażenia najczęściej dochodzi poprzez spożycie żywności skażonej bakteriami. Objawy kliniczne jersiniozy, choroby wywołanej przez *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*, przybierają różne postaci. Z infekcją tymi patogenami wiąże się zapalenie żołądka i jelit, ostre zapalenie węzłów chłonnych, rzekome zapalenie wyrostka robaczkowego, zapalenia stawów, zapalenie spojówki, wysypkę szkarlatynową, rumień guzowaty oraz biegunkę [6].

Wywoływane dysfunkcje i objawy chorobowe w przypadku zakażenia tymi enteropatogenami są bardzo podobne, natomiast szczegółowe analizy pozwalają odróżnić od siebie ww. infekcje. W przeciwieństwie do kolonizującej głównie kępkę Peyera *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* znacznie szerzej rozprzestrzenia się w organizmie. Występują także różnice między ww. gatunkami w wywoływanych postaciach biegunki, stopniu nasilenia bólów brzucha itp. [4, 6].

Y. enterocolitica jest biochemicznie i genetycznie heterogenną grupą organizmów. W obrębie tego gatunku wyróżnia się obecnie około trzydzieści cztery serotypy. Różnice metaboliczne i biochemiczne pozwalają na wyodrębnienie sześciu biotypów (1A, 1B, 2, 3, 4 i 5) [6]. Poszczególne szczepy *Y. enterocolitica* różni także stopień zjadliwości. Wirulentne szczepy biotypów 1B, 2, 3, 4 i 5 posiadają plazmid pYV (*Yersinia* virulence) [18]. Plazmid pYV koduje adhezynę YadA, a także system sekrecji III typu. Podstawową funkcją efektorowych białek Yop (*Yersinia* outer membrane proteins) systemu sekrecji jest hamowanie reakcji obronnej gospodarza. Charakterystykę III systemu sekrecji funkcjonującego u patogennych gatunków z rodzaju *Yersinia* oraz rolę białek Yop w procesie patogenezy przedstawiliśmy szczegółowo wcześniej [8, 21, 27].

Do biotypu 1A należą szczepy, które utraciły plazmid pYV, a także locus *ail*, geny *myf* i *ystA* oraz nie mają funkcjonalnego genu *inv*. Biotyp 1B – „Nowego Świata” (złożony głównie ze szczepów izolowanych w Stanach Zjednoczonych) posiada dodatkowe czynniki zjadliwości, w tym wyspę patogenności HPI 1 (high pathogenicity island) i jest najbardziej zjadliwy. Na wyspie HPI 1 znajdują się geny, kodujące białka uczestniczące w biosyntezie i transporcie sideroforu – jersiniobaktyny. Biotypy od 2 do 5, (izolowane głównie w Europie i Japonii) pozbawione wyspy HPI, zestawia się często w jedną grupę nazywaną *Y. enterocolitica* „Starego Świata”, o znacząco mniejszej zjadliwości niż biotyp 1B [6, 40].

Pozostałymi czynnikami zjadliwości *Y. enterocolitica*, kodowanymi chromosomowo są: inwazyjna *Inv*, adhezyny *Ail* i *Myf*, ureaza oraz enterotoksyny *Yst*.

Ze względu na różnice w budowie antygeny O-swoistego LPSu wyróżnia się 21 serotypów *Y. pseudotuberculosis*. Serotypy te przyporządkowuje się do

sześciu grup, biorąc pod uwagę zdolność do produkcji egzotoksyn YPM (*Y. pseudotuberculosis*-derived mitogen), obecność całej wyspy HPI lub tylko jej prawej części (R-HPI) oraz różnice w występowaniu i wybranych cechach biochemicznych [19]. We wszystkich szczepach *Y. pseudotuberculosis* obecny jest plazmid pYV, a na chromosomie kodowane są oprócz toksyn YPM, także: inwazyjna Inv, adhezyna Ail, antygen pH 6 (odpowiednik Myf *Y. enterocolitica*). Białka Hms kodowane są na jednej z mniejszych wysp genomowych. Hms umożliwiają tworzenie biofilmów, ale ich rola w procesie patogenyzy jest prawdopodobnie niewielka (odwrotnie niż u *Y. pestis*) [13].

3. *Y. pestis* – epidemiologia i patogenyza

W przeciwieństwie do spokrewnionych enteropatogennych gatunków *Yersinia*, *Y. pestis* jest bardzo wrażliwa na promieniowanie słoneczne i temperaturę, i nie jest zdolna do przetrwania dłuższego okresu czasu poza organizmem gospodarza. Głównym rezerwuarem *Y. pestis* są dzikie populacje gryzoni, wliczając w to różne gatunki szczurów, myszy, nornic i myszokoczków. Wśród tych enzoptycznych gospodarzy większość jest odporna na zachorowanie (bądź, w przypadku niektórych gatunków, spowodowane dżumą ubytki w populacji są rekompensowane znacznym rocznym przyrostem). Mechanizmy przenoszenia, utrzymywania się pałeczki dżumy w populacjach ssaków i zdolności do wywoływania nagłych epidemii są trudne do zbadania, m.in. ze względu na kryptyczny charakter inwazji w enzoptycznych populacjach ssaków. Ostatnio jednak zwiększone zainteresowanie tym zagadnieniem i nowe metody badawcze przyniosły rezultaty w postaci opracowania kilku modeli zależności pomiędzy drobnoustrojami, przenoszącymi je gospodarzami i zwierzętami wrażliwymi na zakażenie. Otrzymano także wstępne dane dotyczące ekspansywności szczepów *Y. pestis* na nowe terytoria i mechanizmów wybuchania nagłych epidemii [20].

Głównym wektorem odpowiedzialnym za przeniesienie zakażenia w populacjach zwierząt są pchły, ponad 80 gatunków (z ponad 1500), z których najczęstszym są *Xenopsylla cheopis* (pchła szczurza) i *Pulex irritans* (pchła ludzka). Pchły odpowiedzialne są także za transmisję bakterii na inne, wrażliwe ssaki (ponad 200 gatunków z 70 rodzajów, w tym także ludzie), u których wywołują dżumę, chorobę o bardzo ciężkim przebiegu i wysokiej śmiertelności.

Przeniesienie bakterii rozpoczyna się, gdy pchła ugryzie ssaka – nosiciela. Zainfekowana krew tworzy w przedniej części jelita, zwanej przedżołądkiem (proventriculus) skrzep, który uniemożliwia insektowi przełykanie, a dla bakterii jest miejscem namnażania.

Pchła nie jest także w stanie przełknąć krwi, zaaspirowanej po ugryzieniu kolejnego wrażliwego gospodarza. Zwraca ją z powrotem do miejsca ugryzienia wraz ze znaczną liczbą bakterii, ocenianą na 11 000–24 000 komórek, które rozprzestrzeniają się do okolicznych węzłów chłonnych. Ze względu na niższą temperaturę ciała pchły, bakterie w momencie inwazji pozbawione są ochronnej otoczki (antygen F1, eksprymowany w 37°C), co czyni je podatnymi na fagocytozę przez leukocyty polimorfonuklearne (PMN) i makrofagi. Jednakże zdolność do przeżycia i namnażania w makrofagach (choć nie w PMN) pozwala *Y. pestis* przetrwać okres dostosowania się do zmienionego środowiska. Synteza indukowanych temperaturą 37°C czynników wirulencji (ekspresja antygeny F1 w 37°C zachodzi po 3h w warunkach *in vitro*) prowadzi do masowej proliferacji *Y. pestis* w węzłach chłonnych, po czym bakterie przechodząc do krwiobiegu infekują m.in. wątrobę, śledzionę i płuca. Rozwój ciężkiej bakteremii (stężenie bakterii osiąga co najmniej 10⁶CFU/ml) pozwala na skuteczne zakażenie niezainfekowanych pcheł żerujących na gospodarzu [33].

Obecność i masowe namnażanie się bakterii w węzłach chłonnych prowadzi do stanu zapalnego. Znacznie powiększone gruczoły limfatyczne (nawet do 10 cm) przyjmują postać tzw. dymienic. Jest to typowy objaw choroby zwanej dżumą dymieniczą. Chorobę tę charakteryzują ponadto: gorączka, drgawki, osłabienie, bóle głowy i brzucha itp. W końcowych fazach dochodzi do krwotoków, zakrzepic i zapaści. Nieleczona dżuma dymienicza prowadzi do śmierci w 50% przypadków. Przedostanie się bakterii do płuc wywołuje dżumę płucną. Objawia się ona wysoką gorączką, bólami głowy, dreszczami, apatią oraz kaszlem (często krwawym lub ropnym). Okazjonalnie występują także dymienice na szyi. Infekcji towarzyszą krwotoki, a płuca wypełniają się płynem. Nieleczona w ciągu pierwszych 24 godzin choroba ma 100% śmiertelność, wskutek uszkodzeń układu oddechowego i systemowej zapaści. Postać płucna charakteryzuje się ponadto wysoką zakaźnością. Masowa obecność bakterii w krwiobiegu jest charakterystyczna dla wszystkich postaci dżumy, prowadząc do typowych objawów szoku septycznego. Dżuma posocznicowa charakteryzuje się podobnymi objawami jak posocznice wywoływane przez inne Gram-ujemne bakterie (m.in. szok septyczny i zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego), a śmiertelność wynosi 100% (nieleczona). Jeden z charakterystycznych objawów, martwica dystalnych naczyń krwionośnych, towarzyszących infekcji, spowodował, że dżuma zyskała nazwę „Czarna Śmierć”.

Y. pestis uważa się za czynnik etiologiczny trzech wielkich pandemii, z których dwie pierwsze zdiesiątkowały ludność Europy i Afryki Północnej: plaga Justyniana (541–767 A.D.) i „Czarna Śmierć” (od 1346

do piętnastego wieku). Współcześnie (od roku 1894) trwa trzecia pandemia (Pandemia Nowożytna), wywoływana przez szczepy klasyfikowane do biotypu Orientalia [45].

Jeszcze do niedawna w powszechnym użyciu pozostawał wprowadzony przez Devignata w 1951 roku podział *Y. pestis*, oparty na zdolności do fermentacji glicerolu i redukcji azotanów, na trzy biotypy (Antiqua, Mediaevalis i Orientalis) skorelowany historycznie z tymi trzema wielkimi epidemiami dżumy. Od lat trwają badania mające na celu zweryfikowanie poglądu, że pierwsza i druga pandemia zostały wywołane przez odpowiednio, bakterie z biotypów Antiqua i Mediaevalis. Wprowadzenie nowych metod badawczych w ostatnich latach przyniosło wyniki podważające zarówno monofiletyczność tych biotypów (a więc i zasadność podziału), jak i ich historyczne powiązania. Potwierdzono także przynależność do gatunku *Y. pestis* odmiennych fenotypowo szczepów, przypisanych obecnie do biotypów Microtus i *Yersinia pestis pestoides* (oba awirulentne dla człowieka) [1]. Relacje wewnątrzgatunkowe i taksonomia *Y. pestis* są obecnie przedmiotem intensywnych analiz. Omówienie dotychczasowych wyników i propozycja zrewidowanej taksonomii zostaną przedstawione w dalszej części pracy.

4. Czynniki zjadliwości *Y. pestis* kodowane na chromosomie

Y. pestis syntetyzuje wiele czynników zjadliwości niezbędnych do infekcji i namnażania się w organizmach gospodarzy oraz efektywnej transmisji przez pchły. Wiele z tych czynników charakterystyczna jest także dla *Y. pseudotuberculosis*.

Kodowany chromosomowo czynnik PsaA (antygen pH 6, odpowiednik Myf *Y. enterocolitica*) podobnie jak u *Y. pseudotuberculosis*, wyrażany jest tylko w temperaturze od 35°C do 41°C i zakresie pH od 5 do 6,7. Jest to fibrylarne białko o masie cząst. 15 kDa, biorące udział w odporności bakterii na fagocytozę. PsaA produkowane jest głównie wewnątrz komórek eukariotycznych, przede wszystkim makrofagów, w odpowiedzi na zakwaszenie środowiska fagolizosomu [38]. Do niedawna postulowano także rolę PsaA jako adhezyny, lecz badania wykazały, że mutanty PsaA⁻ nie mają zmniejszonej zdolności adhezji do komórek eukariotycznych. Jednocześnie zaobserwowano, że po zaindukowaniu ekspresji PsaA w makrofagach, uwolnione komórki bakteryjne wykazują zwiększoną oporność na fagocytozę. Antygen pH 6 wydaje się być trzecim, obok białek Yop (kodowanych na plazmidzie pCD1 u *Y. pestis* i pYV u *Y. pseudotuberculosis*) i antygeny F1 (kodowanego na plazmidzie pMT1 *Y. pestis*) czynnikiem obrony przed fagocytozą, szczególnie istotnym

we wczesnych etapach inwazji [26]. Jest to jednocześnie jeden z niewielu kodowanych chromosomowo czynników wirulencji *Y. pseudotuberculosis*, który utrzymał się w funkcjonalnej postaci u pałeczki dżumy. Główna adhezyna i inwazyjna *Y. pseudotuberculosis*, tj. odpowiednio YadA oraz Inv odpowiadające za infekcję przewodu pokarmowego, są nieaktywne u *Y. pestis*. Najnowsze badania wykazały, że w procesie kolonizacji i rozprzestrzeniania *Y. pestis* udział biorą adhezyny: Ail [29], YadBC [17] oraz YapE [30].

Na chromosomie *Y. pestis* znajduje się kompletna i funkcjonalna wyspa patogenności HPI 1 [9, 40]. Wyspa jest prawdopodobnie wysoce konserwowana w obrębie zarówno rodzaju, jak i gatunku; wykazano bowiem 98% podobieństwo sekwencji genów HPI pomiędzy *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* 1B i *Y. pseudotuberculosis*. Należy także zauważyć, że wysoki stopień homologii sekwencji nukleotyduowej wyspy zachodzi także pomiędzy patogenami z rodzaju *Yersinia*, a innymi bakteriami przenoszącymi HPI, np. *E. coli*. Wysoka homologia sekwencji dotyczy bogatej w pary GC, „funkcjonalnej” części wyspy, nie zaś wysoce zmiennej w obrębie rodzaju *Yersinia* części bogatej w pary AT. Ta ostatnia charakteryzuje się niższą, odmienną od reszty HPI zawartością procentową par GC (32–44%, przy 56,4% dla części konserwowanej i 47,64% dla reszty genomu *Y. pestis* CO92) i zajmuje od 13% (u *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis*) do 28% (u *Y. enterocolitica*) długości wyspy. W konserwowanej ewolucyjnie części znajdują się wszystkie geny biosyntezy i transportu yersiniobaktyny (tj. geny *irp1* – 9), receptora dla tego sideroforu – białka *fyuA* oraz sekwencje: *intB* – integrazy oraz regulatora transkrypcji – *ybtA*.

U *Y. pestis* obecne są wszystkie elementy insercyjne wykryte w HPI u *Y. pseudotuberculosis* oraz delecja 10 kbp odcinka nie kodującego w lewej części wyspy, a obecne u *Y. enterocolitica*.

HPI 1 u *Y. pestis* znajduje się w obrębie większego chromosomalnego locus zwanego *pgm* (pigmentation), w skład którego wchodzi także geny *hms*. Cały, 102 kb fragment oflankowany jest sekwencjami IS100 i wycina się z chromosomu z częstością 10⁻⁵. Sekwencja HPI posiada wszystkie niezbędne do samodzielnego wycinania się elementy i prawdopodobnie jest zdolna do spontanicznej delekcji (jak u *Y. pseudotuberculosis*) jednak jej mobilność jest maskowana przez wyższą mobilność całego *pgm* [9].

Warto zauważyć, że *Y. pestis* z delecją locus *pgm* charakteryzuje się obniżoną wirulencją u myszy, która może zostać przywrócona wstrzyknięciem żelaza zakażonym zwierzętom. Wskazuje to na bardzo istotną rolę żelaza w procesach życiowych patogenów, a co za tym idzie, na rolę sideroforów jako czynników wirulencji [9].

Białka Hms kodowane są na pozostałej części locus *pgm*. Fenotyp Hms⁺ objawia się tworzeniem w temp.

25–28°C, brązowych lub czerwonych kolonii bakterii hodowanych na odpowiednich podłożach różnicujących (np. z heminą lub strukturalnym analogiem – czerwienią Congo). Ta cecha „pigmentacji” nadała nazwę całemu 102 kb regionowi *pgm*, w obrębie którego znajduje się locus *hms*. W sekwencji nukleotydowej tego regionu zidentyfikowano 4-genowy operon *hms*HFRS. Dwa kolejne geny *hmsT* i *hmsP* znajdują się poza locus *hms*. Eksprymowane białka HmsF i HmsH mają zdolność wiązania heminy i zatrzymywania jej w postaci związanej z błoną zewnętrzną. Białka HmsR, HmsS i Hms T są enzymami związanymi z błoną cytoplazmatyczną i uczestniczą w syntezie zewnątrzkomórkowego polisacharydu podobnego do poli(N-acetyloglukozaminy). Rola białek Hms w wirulencji u ssaków nie została potwierdzona i prawdopodobnie jest niewielka (zwłaszcza, że geny *hms* ulegają ekspresji głównie w temperaturze 25°C). Natomiast obecność funkcjonalnego locus *hms* jest niezbędna do zablokowania, przez masę bakteryjną, jelita pchły, a ściślej przedłożadka [25]. Ten żywieniowy zator (zahamowanie przepływu zaaspirowanej krwi) sprzyja efektywnej transmisji zainfekowanej pchły, która „wygłodzona” poszukuje kolejnego gospodarza. Rola białek Hms polega prawdopodobnie na zdolności komórek bakterii do aglutynacji i tworzenia biofilmów (obserwowana także u *Y. pseudotuberculosis*) [13]. W przeciwieństwie do HPI, część *pgm* kodująca białka Hms nie różni się znacząco zawartością par GC od reszty chromosomu *Y. pestis* i nie jest uważana za wyspę patogenności [40].

Na podstawie różnic w procentowej zawartości par GC, na chromosomie *Y. pestis*, podobnie jak u *Y. pseudotuberculosis* wykryto ok. 20 innych, pomniejszych wysp genomowych, z których większość to wyspy patogenności. Domniemywane produkty ekspresji genów zlokalizowanych w tych obszarach to m.in. siderofory, toksyny owadzie, adhezyny i geny metabolizmu kwasów tłuszczowych. Część z tych genów u *Y. pestis* została zainaktywowana w toku ewolucji, co wykazały analizy porównawcze z genomem *Y. pseudotuberculosis*, w którym wykryto 18 z 21 obecnych u *Y. pestis* wysp genomowych. Przykładem są tutaj geny toksyn owadzie (np. *tcaB*) [45]. Na jednej z wysp patogenności kodowany jest także drugi system sekrecji typu III, homologiczny do kodowanego na SPI 2 *S. enterica* serovar Typhimurium, choć nie wydaje się pełnić równie ważnej funkcji w namnażaniu wewnątrzkomórkowym jak u *Salmonella*.

Międzygatunkowe porównania zawartości i funkcjonalności wysp genów pomiędzy *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis* wykazały, że u tego ostatniego gatunku wiele z tych genów jest nieaktywnych. Analizy te wniosły bardzo wiele w zrozumienie mechanizmów mikroewolucji i pomogły stworzyć wiarygodny model rozwoju *Y. pestis* w kierunku wysoce patogennego

gatunku. Uwagę zwraca tu zwłaszcza rola toksyn owadzie i ich późniejszej inaktywacji, w przystosowaniu się bakterii do wykorzystywania pcheł jako wektora transmisji.

5. Czynniki wirulencji kodowane na plazmidach: pCD1, pPCP1 oraz pMT1

Plazmid pCD1, homologiczny do plazmidu pYV *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica*, określane także pCad, pVW, pYV, lub pLcr wyizolowany ze szczepu CO92 *Y. pestis* ma wielkość 70 305 pz, natomiast plazmid ze szczepu KIM10 – 70 509 pz. Różnicę w wielkości przypisuje się delecji 212 pz w sekwencji IS285 [3]. Zawartość par GC wynosi 44,8% (KIM10). Na plazmidzie rozpoznano dużą liczbę różnych sekwencji insercyjnych (głównie IS100 i IS285) i transpozonów. Dwa geny kodujące: *YadA*, ważny czynnik adhezji oraz oporności na surowicę u *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* oraz lipoproteinę YlpA są nieaktywne (w wyniku delecji prowadzącej do zmiany ramki odczytu – *ang.* frameshift). Odnaleziono natomiast funkcjonalne homologi wszystkich białek Yop i Ysc systemu sekrecji III typu, zlokalizowanych na plazmidzie pYV u *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica*. Jednak sam układ genów plazmidu pCD1 uległ znaczącej rearanzacji w stosunku do plazmidów pYV tych dwóch enteropatogennych gatunków [25].

Kodowane na plazmidzie pCD1 białka Ysc systemu sekrecji, tworzą strukturę „molekularnej strzykawki”, za pomocą której białka efektorowe Yop dostają się do cytoplazmy komórek eukariotycznych. Paraliżując funkcje makrofagów, białka te chronią komórki bakteryjną przed fagocytozą. Efektem działania białek Yop jest hamowanie nieswoistej odpowiedzi immunologicznej (od blokowania odpowiedzi zapalnej do indukcji apoptozy makrofagów włącznie). Cały system sekrecji III typu ma pierwszorzędne znaczenie dla wirulencji gatunków *Yersinia*, zapewniając przeżycie w organizmie gospodarza [21].

Plazmid pPCP1 (określany także jako pPst, pPla) jest to najmniejszy z typowych plazmidów *Y. pestis* (9 610 pz w szczepie KIM10, 45,3% zawartości par GC) i zawiera geny: pestycyny (bakteriocyna), oporności na pestycynę (wprowadzają presję selekcyjną w kierunku utrzymania plazmidu na zasadzie klasycznego systemu toksyna – antytoksyna) oraz aktywatora plazminogenu (proteaza Pla) [3].

Białko Pla o masie cząsteczkowej 34,6 kDa posiada aktywność proteolityczną w stosunku do plazminogenu, aktywując go do plazminy. W dodatku Pla inaktywując inhibitor plazminy, alfa 2-antyplazminę prowadzi do niekontrolowanej proteolizy plazminy, co ułatwia bakteriom rozprzestrzenianie się w organizmie

gospodarza, głównie wskutek likwidacji skrzepów fibryny i innych mechanicznych przeszkód, np. składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednakże rola proteazy Pla w wirulencji pałeczki dżumy była przez pewien czas kwestionowana, gdyż badane *in vitro* mutanty Pla⁻ zachowywały pełną zjadliwość [38]. Dopiero niedawne badania wykazały, że obecność Pla jest nieodzowna dla efektywnej infekcji przez skórę, a mutanty Pla⁻ zachowują zdolność do infekcji tylko po bezpośrednim przeniknięciu do krwiobiegu [7]. Wyrażanie białka Pla wydaje się mieć też wpływ na śmiertelność zakażonych pcheł, jednak jego rola w organizmie insekta pozostaje bliżej niewyjaśniona.

Prowadzone od 2000 roku badania dowiodły, że *Y. pestis* jest zdolna do inwazji komórek nabłonkowych, mimo braku kluczowych dla tego procesu adhezyn i inwazyj (YadA i Inv), obecnych u spokrewnionych enteropatogenów. Badania wykazały także niewielką rolę domniemanych czynników inwazji, jak np. antygeny pH6 i białka CafI, wskazując równocześnie na proteazę Pla jako główną adhezynę, a prawdopodobnie także inwazyję *Y. pestis* [12]. Udało się także rozdzielić aktywność proteolityczną od właściwości adhezyjnych i inwazyjnych białka Pla. Ponadto w strukturze trzeciorzędowej Pla zidentyfikowano motyw odpowiadający za wiązanie białka z lipidem A lipopolisacharydu (LPS). Ostatnio dowiedziono także, że O-antygen gładkiej formy LPS może sterycznie hamować aktywność proteolityczną Pla, co sugeruje że w ewolucji *Y. pestis* utrata O-antygeny w cząsteczce LPS dawała przewagę selekcyjną związaną z funkcjonowaniem białka Pla [43].

Wielkość trzeciego plazmidu *Y. pestis* – pMT1 (określany także jako pFra, pTox lub pYT) w szczepie KIM10 wynosi 100 984 bp; a zawartość par GC – 50,2%. Plazmid zawiera kilka kopii elementów insercyjnych, m.in. dwie kopie IS100 i jedną kopię IS200 (ich obecności przypisuje się inwersje w układzie genów obserwowane w porównaniu do plazmidów izolowanych z innych szczepów). Na plazmidzie pMT1 znajduje się kilka genów o znanej roli w wirulencji *Y. pestis*, np. gen toksyny mysiej – *ymt* i antygeny F1 – *cafI* wraz z genami białek regulatorowych i pomocniczych (np. regulator CafIR i białko opiekuńcze CafIM). Poza tym, plazmid zawiera ok. 40 ORF-ów o nieznanym znaczeniu (m.in. ORF-y homologiczne do genu piliny *E. coli* i genu transportera z rodziny ABC) [26].

Antygen F1 to wyrażane w 37°C białko występujące w formie wysokocząsteczkowych (kilka MDa) polimerów, otaczających komórkę bakterii dwuwarstwową otoczką. Polimery utworzone są prawdopodobnie przez dimeryczne podjednostki połączone wiązaniami wodorowymi. Otoczka chroni bakterie przed fagocytozą ze strony monocytów.

Toksyna mysia (Ymt) jest białkiem wielkości 61 kDa, tworzącym polimery o masach cząsteczkowych 120 kDa

i 240 kDa. Toksyna mysia należy do rodziny fosfolipaz D. Jej rola w wirulencji została potwierdzona eksperymentalnie. Udowodniono, że jest to czynnik zwiększający śmiertelność w populacjach zakażonych gryzoni i co ważniejsze, wymagany do przeżycia bakterii w przewodzie pokarmowym pchły [23]. Badania prowadzone nad wyizolowaną z komórek bakterii toksyną przyniosły odpowiedzi odnośnie aktywności katalitycznej i specyficzności substratowej Ymt, jednak mechanizmy jej działania jako czynnika wirulencji pozostają nieznane [42]. Również kwestia specyficzności działania Ymt wobec przedstawicieli rodziny *Muridiae* (Myszowate) nie została wyjaśniona. Wcześniejsze badania sugerowały, że Ymt może działać poprzez blokadę receptora β -adrenergicznego doprowadzając do zapaści (co wyjaśniałoby toksyczny efekt u myszy i szczurów), hipoteza ta nie została jednak potwierdzona [38]. Innym postulowanym mechanizmem działania jest ochrona komórek przed toksycznymi produktami trawienia surowicy krwi w jelicie pchły [24].

Warto podkreślić, że ponad 50% sekwencji nukleotydowej plazmidu wykazuje bardzo duże podobieństwo (ponad 95%) do kryptycznego plazmidu pHCM2 obecnego w szczepach *Salmonella enterica* serovar Typhi, przy czym homologiczne rejony nie tworzą ciągłego obszaru, lecz są rozsiane po plazmidzie. Zawartość par GC w tych sekwencjach jest bliższa rodzajowi *Salmonella* niż *Yersinia*, co sugeruje enteropatogenne pochodzenie prototypowego plazmidu. Wydaje się zatem prawdopodobne, że między patogenami tych rodzajów zachodziła i nadal zachodzi wymiana materiału genetycznego, choć nie wykluczono też możliwości nabycia plazmidów z odrębnych źródeł [3].

Plazmid pYC jest kryptycznym plazmidem o wielkości 5,9 pz, izolowany ze szczepów *Y. pestis* w Chinach, nie zawiera żadnych wykrytych czynników wirulencji. Odnaleziono na nim 12 ORF-ów, z czego 3 kodują białka homologiczne do znanych białek (m.in. indukowanych uszkodzeniami białek DinJ1 i DinJ2 *E. coli*). Postuluje się rolę tych białek w zwiększaniu zdolności *Y. pestis* do przetrwania niesprzyjających warunków, choć nie obserwuje się u tych bakterii wyraźnie zmienionego fenotypu. Obszar, z którego izoluje się bakterie zawierające pYC stopniowo się powiększa [3], co zdaje się potwierdzać hipotezę, że obecność tego plazmidu daje *Y. pestis* pewne korzyści selekcyjne.

6. Struktura genomu *Y. pestis*.

Inne elementy mające wpływ na patogenność

Zsekwencjonowany genom *Y. pestis* CO92 ma wielkość 4 653 728 pz i procentową zawartość par GC równą 47,64%. W porównaniu z nim, genom *Y. pestis* KIM10 jest o ok. 50 kb mniejszy (4 600 755 bp) i zawiera

4 198 ORF-ów (z czego zaledwie 3 672 odpowiada ORF-om szczepu CO92) [14, 37]. Różnice wielkości przypisuje się większemu udziałowi elementów insercyjnych w genomie szczepu CO92. Ponadto występuje też szereg innych różnic między genomami obu szczepów, m.in.: jeden dodatkowy operon tRNA w sekwencji szczepu KIM oraz znaczny stopień rearanżacji układu genów, zwłaszcza typu inwersji. Charakterystyczne jest występowanie trzech tzw. regionów MIR (multiple inversion regions), w których obserwuje się szczególnie dużo inwersji przy porównaniu obu sekwencji. Dane te świadczą o tym, że genom *Y. pestis* jest wciąż obiektem nieustannych zmian, w przeciwieństwie do dość stabilnych genomów spokrewnionych enteropatogenów.

Zawartość elementów insercyjnych (IS)

Projekty sekwencjonowania genomów *Yersinia* przyniosły dość niespodziewane dane dotyczące liczby obecnych IS, która okazała się nadspodziewanie duża, zwłaszcza w porównaniu z blisko spokrewnioną *Y. pseudotuberculosis*. W sekwencji chromosomów i plazmidów *Y. pestis* CO92 odnaleziono 138 elementów insercyjnych, a u *Y. pestis* KIM – 117 [37]. Najczęściej występującym elementem insercyjnym jest IS1541, następnie IS100, IS285 i IS1661. Natomiast liczba IS w genomie *Y. pseudotuberculosis* nie przekracza 20 (są to także głównie IS1541 i IS100; ich liczba waha się pomiędzy szczepami) [10]. Umieszczenie 12 z tych elementów odpowiada układowi obserwowanemu w obu szczepach *Y. pestis*. Porównanie miejsc integracji IS do genomów szczepów *Y. pestis* CO92 i KIM pozwoliło na stwierdzenie, że ich wspólny przodek miał 109 IS, a więc od czasu rozejścia się linii ewolucyjnych doszło do, odpowiednio, 28 i 8 nowych integracji. Z kolei porównania pomiędzy *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* dotyczące układu konserwowanych bloków genów pozwoliły na ustalenie prawdopodobnych miejsc rekombinacji genomowych i przybliżonej struktury genomów bakterii będących przodkami izolowanych dziś patogenów. Stwierdza się obecnie, że elementy insercyjne i powodowane przez ich obecność rekombinacje odegrały znaczącą rolę w różnicowaniu się pałeczki dżumy.

Duża liczba i aktywność elementów IS są prawdopodobnie głównymi czynnikami odpowiadającymi za niestabilność genomu *Y. pestis* [46]. Przykładem tego jest obserwowana u co najmniej dwóch szczepów znaczna niestabilność wzorów restrykcyjnych genomów, zdradzająca zachodzenie ciągłych rearanżacji genomowych, utrzymująca się nawet po wielokrotnych pasażach [3].

Innym zaobserwowanym efektem obecności elementów IS w genomie *Y. pestis*, wskazującym na ich rolę w gwałtownych przetasowaniach strukturalnych,

są anomalie w typowym układzie nukleotydów na nici prowadzącej i opóźnionej. Po zsekwencjonowaniu genomów kilku gatunków bakterii odkryto zauważalną preferencyjność występowania guaniny na nici wiodącej w replikacji. U *Y. pestis* zaobserwowano natomiast trzy duże anomalie sekwencji bogatych w guaniny (jedną translokację i dwie inwersje), z których każda oflankowana jest elementami insercyjnymi, co sugerowało zajście homologicznej rekombinacji. Przeprowadzone następnie badania (za pomocą reakcji PCR) wykazały, że w populacji bakterii sekwencje te mogą występować w obu orientacjach, dając w rezultacie kilka możliwych wariacji strukturalnych genomu. Rearanżacje wydają się być częste i zachodzić powszechnie podczas wzrostu mikroorganizmów, ale ich wpływ na wirulencję pozostaje bliżej niezbadany [37, 46].

Należy też zauważyć, że elementy insercyjne odpowiedzialne są za inaktywację znacznej części pseudogenów odnajdywanych w genomach szczepów *Y. pestis*, co nie jest powszechnie spotykanym zjawiskiem, jako że najczęstszym mechanizmem inaktywacji genów są mutacje typu frameshift, powodowane przez niewielkie delecje. Podobną do *Y. pestis* tendencję obserwuje się u *Shigella flexneri*, również dość młodego ewolucyjnie patogenu (ok. 270 000 lat od czasu wyodrębnienia z *E. coli*) [32].

Zawartość pseudogenów

Chociaż genomy bakteryjne z reguły są zwarte i zawierają stosunkowo mało niekodującego DNA, pseudogeny spotykane są powszechnie i występują nawet w najmniejszych bakteryjnych genomach. Jednak koncepcja roli utraty genów lub ich inaktywacji w ewolucji patogenych drobnoustrojów powstała stosunkowo niedawno, gdy zsekwencjonowano genomy organizmów takich jak: *Rickettsia prowazekii*, *Mycobacterium leprae* i patogenów z rodzaju *Yersinia*.

Wczesne badania postulowały obecność 149 pseudogenów w genomie *Y. pestis* [37], a nawet ponad dwukrotnie większej liczby [36]. Badania z 2004 roku ustaliły liczbę pseudogenów na 208, z czego 84 jest obecnych w postaci funkcjonalnej u IP32953 *Y. pseudotuberculosis*, a inaktywowanych w KIM10 *Y. pestis*. Pozostałe 124 geny są nieczynne u KIM10 i CO92 *Y. pestis*, lecz tylko dwa z nich mają funkcjonalne homologi u *Y. pseudotuberculosis*. Lista wykrytych pseudogenów nie jest w żadnym razie zamknięta, gdyż wyniki najnowszych badań (przeprowadzanych metodą wielokrotnych porównań sekwencji spokrewnionych drobnoustrojów) podają liczbę 337 pseudogenów w genomie *Y. pestis* (co stanowi jego 8%) i 186 w genomie *Y. pseudotuberculosis* (poprzednie badania wykazały obecność 62). Powstawały one najczęściej wskutek wspomnianych już mutacji typu frameshift i obecności elementów insercyjnych oraz mutacji

nonsensownych [32]. Warto dodać, że w niektórych przypadkach, przy zastosowaniu odpowiednich podłoży selekcyjnych, możliwe jest przywrócenie pierwotnej funkcji genu.

Generalnie, pseudogeny występują częściej u młodych ewolucyjnie, wysoko zjadliwych patogenów (jak *Y. pestis*) niż u ich mniej zjadliwych, a pokrewnych gatunków (*Y. pseudotuberculosis*). Akumulacja ta jest efektem działania głównie dwóch czynników. Pierwszym jest obfitość substancji odżywczych w organizmie gospodarza, która czyni bezużytecznymi wiele genów metabolizmu, potrzebnych drobnoustrojom w środowisku zewnętrznym. Drugim jest zmniejszenie efektywnej wielkości populacji patogenu, która bierze udział w infekcji. Prowadzi to do obniżenia presji selekcyjnej i akumulacji delecji w populacji. Te same przyczyny leżą u podstaw nagromadzenia elementów insercyjnych, które powodują powstawanie kolejnych pseudogenów. W przypadku *Y. pestis* nabycie zdolności do kolonizowania pcheł pozwoliło na uzyskanie dostępu do substancji odżywczych (aminokwasy, nukleozydy, witaminy) i źródeł energii (D-glukoza i kwasy tłuszczowe) rozpuszczonych w pobieranej przez insekta krwi. Zgodnie z podanym wyżej mechanizmem, spowodowało to utratę genów odpowiedzialnych za np. fermentację złożonych węglowodorów czy syntezę pewnych aminokwasów. Poza tym, w przypadku niektórych mutacji, niewykluczone jest, że zaszły późno w ewolucji i przyczyniły się efektywnie do zwiększenia wirulencji. Rozważa się możliwość, że np. utrata funkcji aspartazy (prowadząca do zmian w metabolizmie kwasu L-glutaminowego) lub dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu (uniemożliwiająca wykorzystywanie szlaku pentozofosforanowego) mogła okazać się korzystna dla patogenów i powodować nasilenie objawów chorobowych [7].

Należy w tym miejscu zaznaczyć rolę jaką miało nabycie genów toksyn owadzych (jeszcze przed wyodrębnieniem się *Y. pseudotuberculosis*), a następnie ich inaktywacja, w procesie kolonizowania organizmu pchły. *Y. pseudotuberculosis* posiada na chromosomie geny kompleksów toksyn owadzych, należące do trzech rodzin genowych (*tcaA/tcaB/tcdA*, *tcaC/tcdB* i *tccC*). Ich obecność sugeruje, że patogen ten jeszcze przed wyodrębnieniem się *Y. pestis* był w stanie zakażać i zabijać owady, prawdopodobnie w celu pozyskania dodatkowych substancji odżywczych. Homologi tych genów są obecne u *Y. pestis*, lecz tylko gen *tcaA* zachował funkcjonalność. Gen *tcaB* zawiera mutację typu frameshift, a gen *tcaC* wewnętrzną delecję [37]. Inaktywacja tych genów mogła okazać się konieczna, by wykorzystać możliwości transmisji, które otworzyło nabycie plazmidu pMT1, w połączeniu z produktami *locus* Hms. Jednak wyniki badań z 2004 roku przeczą hipotezie jakoby inaktywacja *tcaB* była niezbędna do transmisji

poprzez owada, gdyż gen ten został odnaleziony w kompletnej formie u kilku w pełni wirulentnych szczepów z biotypów *Mediaevalis* i *Antiqua* [10]. Kwestia roli mutacji w tych genach pozostaje więc na razie nie rozstrzygnięta.

Na uwagę zasługuje też utrata przez *Y. pestis* wielu genów związanych bezpośrednio z wirulencją *Y. pseudotuberculosis*. Inaktywacji uległo wiele genów związanych z inwazją tkanki nabłonkowej jelita jak np. *inv*, *yadA*, *ureD* (wszystkie z nich należą do podstawowych czynników wirulencji *Y. pseudotuberculosis*, a także *Y. enterocolitica*) oraz genów struktury i biosyntezy rzęsek. Inne pseudogeny *Y. pestis*, które wpływają na zwiększenie inwazyjności u innych patogenów (np. u zjadliwych szczepów *E. coli*) to m.in. geny intyminy oraz czynnika CNF (który oddziałując z Rho-GTPazami wpływa na rearanżacje cytoszkieletu komórek eukariotycznych). Inaktywacja tych genów w toku ewolucji dobrze odzwierciedla proces adaptacji pałeczki dżumy do nowej niszy; utratę możliwości infekcji poprzez układ pokarmowy na rzecz transmisji z udziałem insekta i rozprzestrzenianie się w organizmie wraz z krwią. Trudno było za to początkowo wytłumaczyć charakterystyczną cechę fenotypu *Y. pestis*, jaką jest obecność „szorstkiego” lipopolisacharydu, tj. pozbawionego bocznego łańcucha O-swoistego (co jest efektem mutacji w pięciu genach, m.in. *wzy*). U *Y. pseudotuberculosis* jest on obecny, zawiera rzadko spotykane cukry, 3,6-dideoksyheksozy i uważany był pierwotnie za ważny czynnik wirulencji, któremu przypisywano rolę m.in. w obronie bakterii przed składnikami osocza, fagocytozą oraz kationowymi peptydami produkowanymi w jelicie cienkim przez komórki Panetha [37]. Utrata łańcucha O-swoistego wydawała się więc niekorzystna dla wirulencji *Y. pestis*. Jednak nowsze badania wskazują, że jego rola polega raczej na ochronie enteropatogenów poza organizmem gospodarza (szczepy *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* hodowane w temperaturze 37°C w ogóle nie syntetyzują łańcuchów O-swoistych) oraz, że to właśnie „szorstka” forma LPSu odpowiada za skuteczną obronę przed układem dopełniacza i innymi składnikami ludzkiego osocza oraz indukuje bardzo słabą nieswoistą odpowiedź immunologiczną [7]. Ostatnio wykazano także, że genetycznie zmodyfikowany szczep *Y. pestis* syntetyzujący kompletny LPS nie jest w stanie wywołać systemowej infekcji na modelu mysim [34].

7. Badania nad pokrewieństwem ewolucyjnym patogennych gatunków z rodzaju *Yersinia*

Już w latach siedemdziesiątych XX wieku próbowano ustalić stopień pokrewieństwa między patogennymi gatunkami *Yersinia*. Dopiero jednak przeprowadzone

w końcu XX wieku badania nad pokrewieństwem ewolucyjnym tych trzech gatunków przyniosły ostateczne potwierdzenie wcześniejszych spostrzeżeń o bliskim pokrewieństwie *Y. pestis* z *Y. pseudotuberculosis* oraz zaskakujące wyniki dotyczące prawdopodobnego czasu specjacji *Y. pestis*. Badania te prowadzono używając metody MLST (Multi Locus Sequence Typing). Zsekwencjonowano odcinki (każdy o wielkości ok. 400 bp) pięciu genów metabolizmu podstawowego (*thrA*, *trpE*, *glnA*, *tmk*, *dmsA*) oraz genu fosfo-mannomutazy *manB*, zaangażowanej w syntezę lipopolisacharydu. Źródłem sekwencji było 36 szczepów *Y. pestis*, 12 szczepów *Y. pseudotuberculosis* i 13 szczepów *Y. enterocolitica*. Wykryte różnice w sekwencjach tych genów stanowiły podstawę do analiz filogenetycznych. Potwierdzona została w ten sposób przynależność gatunkowa wszystkich zbadanych szczepów *Y. pestis* (praktyczny brak różnic w allelach wszystkich sześciu genów), wskazując jednocześnie, że wyodrębnienie się ze wspólnego przodka zaszło niedawno. Natomiast różnice pomiędzy szczepami *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* nie były znacząco większe niż w obrębie szczepów samej *Y. pseudotuberculosis*. Niewielka liczba zmian polimorficznych, stanowiących element zmienności genomu (zmian w sekwencji nukleotydu DNA występujących w populacji z częstością większą niż 1%, ale nie prowadzących do zmian w sekwencji polipeptydowej i cech fenotypowych) dowiodła, że *Y. pestis* jest klonem *Y. pseudotuberculosis* i to niedawno wyodrębnionym. Natomiast pokrewieństwo do *Y. enterocolitica* okazało się dalsze niż przypuszczano, odpowiadając dystansem genetycznym relacji *E. coli* z *Salmonella* sp. [2].

Do określenia prawdopodobnego czasu wyodrębnienia się *Y. pestis* zastosowano metodę zegara molekularnego. Ta zaproponowana w latach 60-tych analiza opiera się na hipotezie, która zakłada stałe tempo zachodzenia podstawień nukleotydu w czasie. Znając tempo podstawień można, na podstawie różnic w sekwencji alleli, określić czas dywergencji sekwencji wyjściowej. Głównym problemem ograniczającym użycie zegara jest skalibrowanie go, gdyż tempo zmian jest różne dla różnych organizmów i może się zmieniać nawet w obrębie gatunku. Ponadto należy zauważyć, że metoda ta pozwala określić czas, jaki upłynął od wyodrębnienia się wspólnego przodka, tzw. „molekularnej Ewy”, nie zaś czas specjacji. Wykazano jednak, że w przypadku *Y. pestis* „molekularna Ewa” mogła rzeczywiście być przodkiem wyodrębnionego później gatunku (m.in. ze względu na brak głęboko zakorzenionych różnic w stosunku do *Y. pseudotuberculosis*) [16]. Wyliczane na podstawie różnych danych (m.in. porównań z czasem specjacji *Salmonella* sp.) tempa podstawień wahały się od 6×10^{-9} (podstawień/parę/rok) do 3×10^{-8} nagromadzonych polimorfizmów na

rok. W oparciu o te założenia oceniono czas zaistnienia „molekularnej Ewy” dla *Y. pestis* i *Y. enterocolitica* na 41–186 milionów lat wstecz. Analogicznie, wspólny przodek dla *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* istniał około 0,4–1,9 miliona lat temu. Natomiast czas zróżnicowania się *Y. pestis* jako „gatunku” określono na 1 500 – 20 000 lat temu [2].

Choć wyniki te spotkały się z zainteresowaniem i były szeroko cytowane w literaturze naukowej, w 2004 roku ten sam zespół badawczy wskazał na niedoskonałości zastosowanej metody i zaproponował jej udoskonalenie. Ponieważ zaobserwowane niedokładności zależały od użytej do kalibrowania zegara molekularnego metody, tym razem oparto wnioskowanie na danych zebranych przy użyciu trzech technik: poszukiwania synonimicznych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (sSNP), analizy zróżnicowania liczby tandemowych powtórzeń (MLVA) i analizy wzorów insercji elementów IS100.

Należy zauważyć, że zwłaszcza MLVA zyskała w ostatnich latach uznanie jako wartościowa metoda genotypowania. Spośród innych używanych metod trudno o taką, która łączyłaby wysoką zdolność rozdzielczą, prostotę wykonania oraz powtarzalność z możliwością łatwego porównywania danych między ośrodkami badawczymi. Analiza metodą MLST charakteryzuje się znacznie mniejszą rozdzielczością niż MLVA, pochłaniając jednocześnie dużo czasu. Typowanie elementów IS w połączeniu z metodą „Southern blot” daje bardzo dobre wyniki, jednak otrzymane dane trudno porównywać z wynikami z innych laboratoriów. Modyfikacja tej metody, typowanie PCR-IS, ułatwia wymianę danych, lecz otrzymywana zdolność rozdzielcza jest już dużo mniejsza [39]. MLVA opiera się na wykrywaniu różnic w zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń (VNTR – Variable Number of Tandem Repeats) w różnych *loci* na chromosomie bakterii, które można łatwo i szybko wykryć poprzez zastosowanie metody PCR z użyciem specyficznych starterów. Ponadto istnienie wielu różnych wariacji liczby powtórzeń w porównywanych *loci* znacznie zwiększa zdolność rozróżnienia blisko spokrewnionych izolatów, co okazało się bardzo istotne w przypadku badań nad *Yersinia* [28], zwłaszcza dla ustalenia filogenetycznego pokrewieństwa drobnoustrojów izolowanych z różnych *foci* na świecie (brak było wcześniej wygodnej metody mogącej wykryć drobne różnice w wysoce homogenym, w obrębie gatunku, genomie *Y. pestis*). Ostatnia z zastosowanych metod, poszukiwanie sSNP, okazała się również zbyt mało rozdzielcza w stosunku do wysoce monomorficznej pałeczki *Y. pestis*. Wyniki otrzymane tą metodą łatwo za to interpretować w kontekście ewolucyjnym.

Zastosowanie tych metod do analizy 156 szczepów *Y. pestis* (zróżnicowanych pod względem gospodarza,

obszaru geograficznego i czasu izolacji) oraz przyjęcie do obliczeń bardziej poprawnego tempa podstawięń ($3,4 \times 10^{-9}$) pozwoliło na dokładniejsze określenie czasu wyodrębnienia się różnych biotypów *Y. pestis* [1]. Czas istnienia wspólnego przodka szczepów CO92 i KIM oceniono na ok. 6 500 lat temu, a wyodrębnienie szczepu 91 001 (biotyp *Microtus*) zaszło jeszcze dawniej (ok. 10 000 lat temu). Porównania ze szczepem IP32953 *Y. pseudotuberculosis* spowodowały uściślenie prawdopodobnego czasu specjacji *Y. pestis* do ok. 13 000 lat temu.

Podstawowe znaczenie dla analiz filogenetycznych w rodzaju *Yersinia* ma oczywiście fakt kompletnego zsekwencjonowania genomów dwóch szczepów *Y. pestis*: KIM10 i CO92, a także szczepu IP 32953 *Y. pseudotuberculosis* i 8081 *Y. enterocolitica*. Porównawcze analizy tych genomów dostarczyły ogromnej ilości danych o zmianach postępujących w nich na przestrzeni tysięcy lat, a w szczególności o roli wysp genomowych i elementów insercyjnych. Na podstawie danych dotyczących genów unikatowych dla każdego z tych patogenów można także wnioskować o ich ewolucyjnej historii po zajęciu dywergencji. W szczepie IP32953 *Y. pseudotuberculosis* wykryto 317 genów (w 36 specyficznych regionach), nie mających swoich odpowiedników w żadnym ze szczepów *Y. pestis*, z czego ok. 80 najprawdopodobniej uległo insercyjnym delekcjom w toku ewolucji. Pozostała część genów (nieobecnych u pałeczki dżumy) może być efektem zachodzenia horyzontalnego transferu genów u *Y. pseudotuberculosis* już po „specjacji” *Y. pestis* [10]. Z drugiej strony, wykryto 112 genów (w 21 regionach) specyficznych dla pałeczki dżumy, z czego 14 udało się przypisać funkcje (m.in. białek błonowych, lipoprotein, esterazy i metylotransferazy), o nie potwierdzonym jeszcze wpływie na wirulencję. Poza tym, stopień homologii DNA pomiędzy *Y. pseudotuberculosis* a *Y. pestis* został określony dokładniej i oceniony na ok. 97%, niezmienną w znacznym stopniu jest także organizacja genomów obu patogenów.

8. Relacje wewnątrzgatunkowe i taksonomia *Y. pestis*

Klasyczny podział gatunku *Yersinia pestis* na trzy biotypy: Antiqua, Mediaevalis i Orientalis wciąż pozostaje w powszechnym użyciu w literaturze naukowej. Wprowadzony w 1951 roku przez De v i g n a t a, podział ten opiera się jedynie na wybranych cechach biochemicznych szczepów i nie wydaje się w żaden sposób korelować ze stopniem wirulencji szczepów względem zwierząt i człowieka [45]. Nie uwzględnia on także znacznej ilości izolowanych szczepów atypowych, które wykazują często unikalne właściwości. Brak także dowodów na bezpośrednie powiązania tych

trzech biotypów z trzema pandemiemi, co sugerował De v i g n a t a. Przyczyny długotrwałego utrzymywania się tego podziału mogą leżeć w rozmieszczeniu *foci* dżumy na Ziemi. Choć zasięg *Y. pestis* obejmuje wszystkie kontynenty, za wyjątkiem Australii, to stanowi on zaledwie 6–7% powierzchni lądowej. Co więcej, od pewnego czasu nie notowano występowania tego patogenu w Europie Centralnej i Zachodniej, Kanadzie i części Ameryki Północnej i Południowej. Pałeczkę dżumy izolowano natomiast na terenie Mongolii, Chin i krajów byłego Związku Radzieckiego. Szczepy *Y. pestis* o znacznej zmienności wewnątrzgatunkowej były tam obiektem dokładnych badań. Niestety wyniki tych prac, opublikowane w języku rosyjskim, przez wiele lat były niedostępne poza tymi krajami. Natomiast piśmiennictwo w języku angielskim dotyczyło w głównej mierze niewielkiej liczby szczepów izolowanych we wschodniej części kontynentu azjatyckiego, gdzie różnorodność wewnątrzgatunkowa pałeczki dżumy jest nieporównywalnie mniejsza (została tam wprowadzona drogą morską na początku dwudziestego wieku, a ostatnia epidemia miała miejsce w latach 1924–1925). Niewielka liczba atypowych szczepów mogła przyczynić się do utrzymania wiarygodności podziału De v i g n a t a. Tymczasem, na przestrzeni dwudziestego wieku, naukowcy z Chin, Mongolii i Związku Radzieckiego opracowali, stosując różne kryteria, kilka klasyfikacji częstokroć znacznie lepiej różnicujących szczepy *Y. pestis* o różnym stopniu wirulencji [3]. Należy zauważyć, że choć ustandaryzowany w 1985 roku (uzupełniony w 1998 r.) podział *Y. pestis* na 6 podgatunków (*Y. pestis pestis*, *Y. pestis altaica*, *Y. pestis caucasica*, *Y. pestis hissarica*, *Y. pestis ulegeica*, *Y. pestis talassica*) pozostaje w powszechnym użyciu w krajach byłego Związku Radzieckiego, to wciąż izoluje się znaczną ilość szczepów atypowych, które trudno zaklasyfikować jednoznacznie do któregoś z tych podgatunków. Jest to bardzo istotne, gdyż szczepy te niejednokrotnie charakteryzują się odmienną od typowej wirulencją. Stwierdzono także, że niektóre z cech używanych do wyznaczenia podgatunków podlegają pewnej zmienności także w ich obrębie. Dodatkowo, brak konsensusu w kwestii zdefiniowania bakteryjnego gatunku (a więc i pochodnych taksonów) także utrudnia wszelkie próby klasyfikacji.

Wprowadzenie do użytku nowych metod badawczych pozwoliło zbadać mechanizmy leżące u podstaw tak wysokiej zmienności. Użycie PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) pozwoliło stwierdzić, że szczepy izolowane w różnych *foci* mają tę samą wielkość chromosomu, ale różnią się wzorami restrykcyjnymi. Badania nad pokrewieństwem ewolucyjnym *Y. pestis* z *Y. pseudotuberculosis*, prowadzone na większej liczbie szczepów obu gatunków przy użyciu metod takich jak hybrydyzacja DNA, rybotypowanie, MLVA i in-

nych oraz dane pochodzące z projektów sekwencjonowania genomów *Y. pestis* CO92 i KIM pozwoliły stwierdzić, że mechanizmy odpowiadające za zmienność pałeczki dżumy są wciąż bardzo aktywne i leżą u podstaw znacznego zróżnicowania, obserwowanego nawet wśród izolatów z jednego *foci*. Za ową tzw. „metastabilność fenotypu” odpowiadają głównie: duża liczba odwracalnych rearanżacji genomowych (powodowanych udziałem IS), zmiany w liczbie tandemowych powtórzeń (wykrywane metodą MLVA), mutacje typu frameshift w genach regulatorowych (wskutek insercji IS, błędów systemów naprawy itp.) oraz niestabilna (nawet w obrębie populacji) liczba plazmidów, która stała się podstawą wyodrębnienia plazmidowarów.

Poznanie tych faktów uświadomiło potrzebę opracowania nowej taksonomii dla *Y. pestis*, oddającej prawdziwe powiązania filogenetyczne. Taksonomia taka nie może się opierać na cechach fenotypowych, gdyż w obliczu znacznej zmienności mutacyjnej takie same fenotypy mogą się pojawiać w różnych liniach ewolucyjnych. Przeprowadzone w 2004 roku badania nad grupą szczepów zaklasyfikowanych do biotypu Mediaevalis (na podstawie ich niezdolności do redukcji azotanów), ale niezdolnych także do fermentacji arabinozy i awirulentnych dla ludzi, dowiodły ich odmiennego profilu genomowego, który pozwolił wyodrębnić tę grupę w nowy biotyp: Microtus [47]. Ta sama cecha fenotypowa (niezdolność do redukcji azotanów) okazała się być efektem dwóch różnych mutacji w genie *napA* (w 205 kodonie w biotypie Mediaevalis i 341 w Microtus), co stwierdzono przy pomocy metody PCR, stosując specyficzne startery. Także za pomocą tej metody udowodniono, że glicerolo-negatywny fenotyp biotypu Orientalis jest efektem pojedynczej delekcji o wielkości 93 kb w genie *glpD* u wszystkich badanych szczepów [47].

Równoległe prowadzone badania potwierdziły gatunkową przynależność szczepów biotypu Microtus oraz szczepów zgrupowanych w biotypie *pestoides* (wcześniej ze względu na zdolność do fermentacji arabinozy i melibiozy, rozpatrywano możliwość zaklasyfikowania ich w randze podgatunku *Y. pseudotuberculosis*, a nawet wyodrębnienia jako osobnego gatunku). Analizy porównawcze prowadzone przy użyciu trzech metod (sSNP, MVLA i badanie wzorów insercji IS100), dzięki którym otrzymano dokładniejsze dane na temat ewolucyjnego dystansu dzielącego *Y. pseudotuberculosis* od wybranych szczepów *Y. pestis*, pozwoliły także na zweryfikowanie monofiletyczności klasycznych biotypów według podziału *Devignata*.

Na podstawie tych wyników zaproponowano nowy podział w oparciu o osiem populacji wydzielonych za pomocą metod grupowania molekularnego. Stwierdzono, że biotypy Antiqua i Mediaevalis są polifiletyczne, a ich cechy charakterystyczne (jak np. niezdolność do

redukcji azotanów) występują u izolatów z różnych, nawet dość filogenetycznie odległych grup (w wyniku różnych mutacji o identycznym lub podobnym efekcie fenotypowym, co jest zgodne z wynikami drugiego zespołu, opisanymi wyżej). Także biotyp *Y. pestis pestoides* zbiera drobnoustroje z różnych grup ewolucyjnych, a wspólna im zdolność do fermentacji arabinozy i melibiozy także nie ma przełożenia na bliskość filogenetyczną.

Wraz z kontrowersjami, które zaczął wzbudzać podział *Devignata*, pojawiły się też wątpliwości co do roli *Y. pestis* jako czynnika etiologicznego pandemii z szóstego i czternastego wieku, gdyż poglądy tego uczonego wspierane były głównie przez przekazy historyczne. Rozpatrywano także możliwość, że pandemie te mogły zostać wywołane przez *Bacillus anthracis* lub *Rickettsia prowazekii*. W 2000 roku użyto zmodyfikowanej metody PCR do analizy DNA otrzymanego z miazgi zębowej zwłok trzech osób z czternastowiecznego grobu we Francji. Przy użyciu starterów komplementarnych do części genu *pla* i unikatowych sekwencji *B. anthracis* i *R. prowazekii* potwierdzono, że średniowieczna epidemia była w rzeczywistości dżumą [41]. W świetle ostatnich badań pozostały jednak wątpliwości co do biotypu (bądź inaczej określonej grupy szczepów) odpowiedzialnego za tę epidemię. Dopiero zastosowanie w 2004 roku nowej metody: MST (Multi Spacer Typing) do analizy DNA pozostałości zębowych ośmiu osób zmarłych prawdopodobnie podczas I i II pandemii, pozwoliło stwierdzić, że obie zostały wywołane przez szczepy klasyfikowane dziś do biotypu Orientalis [15].

9. Zastosowanie filogenomiki porównawczej do badania ewolucji *Y. enterocolitica*

Pałeczki *Y. enterocolitica*, ze względu na różnice w patogenności, tradycyjnie zaliczane są do trzech grup, tj. niepatogenne (biotyp 1A), o niskiej patogenności (biotypy 2–5) oraz silnie patogenne (biotyp 1B). W oparciu o metodę hybrydyzacji DNA-DNA i analizę sekwencji 16S rRNA *Neubauer* i wsp. [35] zaproponowali podział *Y. enterocolitica* na dwa podgatunki, *Y. enterocolitica* podg. *enterocolitica* dla szczepów pochodzących z Ameryki i *Y. enterocolitica* podg. *palaearctica* dla szczepów europejskich.

Z kolei, w 2006 roku do rekonstrukcji filogenezy szczepów *Y. enterocolitica* wykorzystano genomikę porównawczą opartą o metodę mikromacierzy DNA-DNA oraz filogenetyczną analizę matematyczną metodą bayesowską [22]. Badaniom poddano 94 szczepy *Y. enterocolitica* izolowane od: ludzi – 35 izolatów, świń – 35 izolatów, od owiec – 15 izolatów oraz od bydła – 9 izolatów. Należały one do trzech grup, tj. grupy

izolatów niepatogennych, o niskiej patogenności i silnie patogennych. Przeprowadzona analiza potwierdziła obecność 3 odrębnych kładów różniących się stopniem zjadliwości. Ponieważ z analizy wykluczono sekwencje plazmidu pYV wydaje się, że obecność pYV nie jest głównym czynnikiem decydującym o wirulencji analizowanych szczepów. Kład o wysokiej wirulencji stanowił 8,7% analizowanych szczepów – wszystkie izolowane były od ludzi chorych i należały do biotypu 1B. Szczepy kładu o niskiej wirulencji stanowiły 51% analizowanych szczepów (biotypy 2, 3, 4) izolowanych od zwierząt hodowlanych (bydło, świnie, owce) oraz pacjentów. Jako trzeci wyodrębniono kład niepatogenny. Zawierał on 40,3% badanych szczepów, izolowanych od pacjentów i zwierząt hodowlanych. 94,6% należało do biotypu 1A. Wyniki te potwierdziły tym samym skuteczność dotychczasowego biotypowania jako metody do wyróżniania szczepów *Y. enterocolitica*.

U wszystkich wysoce patogennych szczepów zidentyfikowano 125 przypuszczalnych sekwencji kodujących (CDSs), które nie były obecne w pozostałych kładach. Wśród nich znalazło się kilkanaście CDSs wcześniej nie scharakteryzowanych, które mogą kodować czynniki wirulencji takie jak hemolizyna, metaloproteaza, czy białko efektorowe III typu sekrecji. Wśród tych 125 CDSs były elementy insercyjne oraz białka pochodzenia fagowego.

We wszystkich 47 szczepach o niskiej patogenności i w szczepie *Y. enterocolitica* 8081 zidentyfikowano 27 CDSs, które były nieobecne we wszystkich izolatach niepatogennych. Wśród nich były m.in. CDSs kodujące hipotetyczne białka, w tym jedną proteazę, trzy transpozazy dla IS 1667. Z kolei analiza sekwencji rdzeniowej genomów (geny metabolizmu podstawowego) *Y. enterocolitica* różniących się wirulencją wykazała, że tylko 894 CDSs, tj. 20,8% sekwencji rdzeniowej jest wspólna dla wszystkich szczepów, potwierdzając tym samym wysoką heterogenność tego gatunku.

Chociaż znane są genetyczne różnice pomiędzy odpowiednimi biotypami to nie wyjaśniają one całkowicie różnic w procesie patogenezy. Podobnie wciąż nie wiadomo, czy istnieje zależność między różnymi biotypami, patogennością a rodzajem gospodarza zwierzęcego.

W sensie ewolucyjnym *Y. enterocolitica* uważana jest jako gatunek mało spokrewniony z patogennymi *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*. Dane uzyskane z analizy genomowego DNA metodą mikromacierzy wykorzystano do utworzenia drzewa filogenetycznego [22, 45]. Chociaż ustalenie ewolucyjnego porządku specjacji czy podspecjacji dla trzech kładów *Y. enterocolitica* jest niemożliwe, to przeprowadzona analiza wykazała bliskie genetyczne pokrewieństwo szczepów o niskiej patogenności z niepatogennymi, ale także dużo bliższe genetyczne pokrewieństwo niepatogennego kładu z wysokopatogennym niż z kładem niskopatogennym. We-

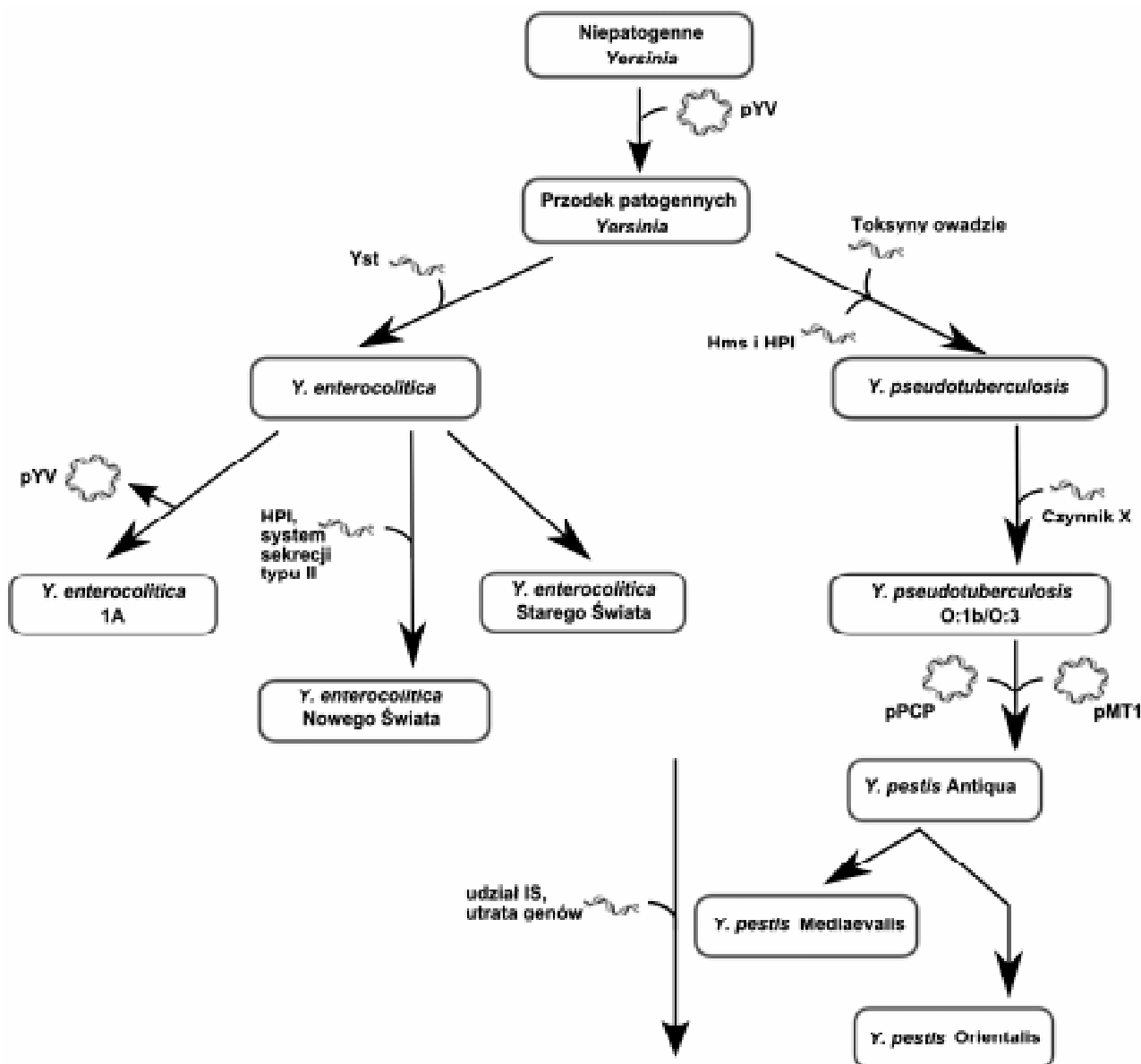
dług jednego ze scenariuszy wydaje się, że kład wysokopatogenny jest bezpośrednim potomkiem wspólnego dla wszystkich *Y. enterocolitica* przodka. Sugeruje to także, że pojawienie się niskopatogennych i niepatogennych szczepów wynikało z biogeograficznych ruchów pomiędzy Nowym Światem i Starym Światem. Możliwy jest także inny scenariusz, według którego wspólny przodek byłby bardziej zgodny ze szczepami Starego Świata (niskopatogenny kład) i byłby także przodkiem dla plazmidu wirulencji, utraconego przez przodka niepatogennego kładu. Oba te scenariusze zakładają, że przodkiem był szczep patogenny (locus *ail* pozostał w obu wysoko- i niskopatogennych kładach, a utracony podczas formowania kładu niepatogennego). Co więcej, utrata plazmidu wirulencji i wyspy patogenności doprowadziła do fenotypu niewirulentnego. Alternatywnie, wyspy patogenności mogły być nabyte niezależnie w drodze transferu horyzontalnego.

10. Proponowany model ewolucji patogennych gatunków rodzaju *Yersinia*

Zebrane w ostatnich latach dane dotyczące czynników wirulencji, filogenetycznego pokrewieństwa oraz domniemanych czasów specjacji patogennych gatunków rodzaju *Yersinia* pozwoliły na podjęcie próby uporządkowania ewolucyjnych wydarzeń, które doprowadziły do pojawienia się tak wysoce wirulentnego patogenu, jakim jest *Y. pestis*.

Zaproponowany model ewolucji genomu *Yersinia*, choć o dużym stopniu prawdopodobieństwa, nie odpowiada jednak na wszystkie pytania [45]. Daje natomiast dobre pojęcie o ogólnych tendencjach ewolucyjnych rodzaju *Yersinia* i jednocześnie podstawę do bardziej szczegółowych analiz.

Według przedstawionego przez Wren a modelu [45] pierwszym wydarzeniem, które otworzyło drogę do zmiany patogenności *Yersinia*, było nabycie plazmidu pYV przez niepatogenną, wolnożyjącą bakterię (Rys. 1). Kodowane na nim kluczowe dla infekcji jelitowych czynniki wirulencji (białka Ysc/Yop i adhezyjna YadA) pozwoliły na kolonizację ciała gospodarza ssaka i unikanie jego najistotniejszych mechanizmów obronnych. Nabycie drogą horyzontalnego transferu genów enterotoksyn Yst pozwoliło na znacznie efektywniejsze rozprzestrzenianie się drogą oralno-fekalną i na wyodrębnienie się ewolucyjnej linii *Y. enterocolitica*. Dalsze wydarzenia pozyskiwania i utraty genów doprowadziły stopniowo do wyodrębnienia się znacznie różniących się wirulencją biotypów *Y. enterocolitica*. Do najistotniejszych wydarzeń tego typu należały: utrata plazmidu pYV, która spowodowała prawie całkowity zanik wirulencji w szczepach biotypu 1A oraz nabycie wyspy patogenności HPI, która drastycznie zwiększyła przeżywalność drobnoustrojów



Rys. 1. Uproszczony model ewolucji gatunków *Yersinia* zaproponowany w oparciu o obecny stan wiedzy.

Przedstawiono najważniejsze wydarzenia prowadzące do wyodrębnienia się izolowanych dziś gatunków.

Y. enterocolitica NW – wysoce zjadliwe szczepy Nowego Świata; OW – umiarkowanie zjadliwe szczepy Starego Świata. Biotypy *Y. pestis pestoides* i *Microtus* nie zostały uwzględnione [za zgodą Wren, 2003].

w ciele gospodarza. Ten ostatni nabytek (oraz dodatkowy system sekrecji – typu II) doprowadził do powstania bardzo zjadliwego biotypu 1B (*Y. enterocolitica* Nowego Świata). Biotypy od 2 do 5, pozbawione wyspy HPI, zestawia się często w jedną grupę nazywaną *Y. enterocolitica* „Starego Świata”, o znacząco mniejszej zjadliwości niż biotyp 1B [6].

W linii ewolucyjnej, która miała doprowadzić do powstania dzisiejszej *Y. pseudotuberculosis* także doszło (niezależnie od linii *Y. enterocolitica*) do uzyskania kompletnej wyspy HPI (odnajdywanej także i u innych *Enterobacteriaceae*), z prawdopodobnie równie silnym wpływem na zjadliwość. Zdolność do tworzenia biofilmów, którym przypisuje się rolę ochronną przed nicieniami (np. *Caenorhabditis elegans*), a na-

wet udział w zwiększonej śmiertelności tych drapieżników, była efektem nabycia *locus* Hms i prawdopodobnie jeszcze innego, bliżej nie scharakteryzowanego czynnika. Wystąpiło też kilkanaście innych przypadków horyzontalnego transferu genów, czego rezultatem jest obecność wysp genomowych, odnalezionych w genomie *Y. pseudotuberculosis* IP 32953, zawierających geny m.in. adhezyn, sideroforów, transporterów oraz kompleksów toksyn owadziej. Owadobójcze właściwości pozwoliły bakteriom uzupełniać braki w substancjach odżywczych podczas przebywania poza organizmem gospodarza. Wątpliwe jest jednak, by były już wtedy zdolne do efektywnego kolonizowania jelita insektów. Stało się to możliwe po uzyskaniu (prawdopodobnie w jelicie gryzonia) plazmidu pMT1

zawierającego geny toksyny mysiej. Ze względu na podobieństwo w sekwencji genów do kryptycznego plazmidu *S. enterica* serovar Typhi, postuluje się, że donorem pMT1 mógł być ten właśnie gatunek.

Połączone efekty działania białek Hms i toksyny Ymt otworzyły bakteriom drogę do kolonizacji nowych nisz. Zdolność do przetrwania w środowisku przewodu pokarmowego pchły, a następnie blokowania go masą bakterii podlegających autoaglutynacji, które mogły przenosić się do organizmu gryzoni podczas ukąszenia przez insekta (gdzie mógł się wyrazić antygen F1, zapewniający ochronę przed fagocytozą) spowodowało ustalenie się podstaw nowego cyklu gospodarz-pchła-gospodarz. Efektywność inwazji została następnie wielokrotnie zwiększona przez uzyskanie plazmidu pPCP1. Aktywator plazminogenu umożliwił szybkie rozprzestrzenianie się patogenów w organizmie i kolonizację narządów takich jak wątroba i śledziona (przy udziale także białek Yop).

Następnie, z powodu „żyźności” nowego środowiska, prowadzącej do utraty zbędnych genów oraz akumulacji elementów IS w wyniku obniżonej presji selekcyjnej, tempo mikroewolucji gwałtownie wzrosło. Zinaktywowanych zostało wiele genów metabolizmu i czynników odpowiedzialnych za inwazję gospodarza poprzez układ pokarmowy (Tabela I).

Utrata zdolności do przetrwania poza organizmem ssaka lub pchły i ściślejsze dostosowanie do transmisji poprzez krew, spowodowały izolację od enteropatogennej populacji *Y. pseudotuberculosis* i przyspieszyły ostateczne wyodrębnienie się nowego, wysoko zjadliwego patogenu. Kolejne mutacje i insercje, akumulowane w szybkim tempie oraz powodowane obecnością coraz liczniejszych IS rekombinacje i stopniowa destabilizacja genomu doprowadziły do różnicowania się *Y. pestis* w kierunku znanych dziś biotypów. Tymczasem rozwój cywilizacyjny człowieka, objawiający się powstawaniem coraz większej liczby miast, spowodował migrację szczurów i pcheł do tych skupisk ludności. Wraz z nimi w kontakt z populacją ludzką weszła *Y. pestis* i okazała się całkowicie zdolna do infekcji organizmu człowieka i części udomowionych już zwierząt. Co więcej, możliwość rozprzestrzeniania się zakażenia drogą kropelkową spowodowała błyskawiczne postępy tej nowej dla człowieka i śmiertelnie groźnej choroby. Rezultatem była pierwsza pandemia dżumy.

Należy zauważyć, że wysoka śmiertelność, będąca efektem ciężkiej bakteremii sprawia, że strategia pałeczki dżumy jest bardzo nieproduktywna. Optymalnym rozwiązaniem dla endopasożyta jest unikanie uśmiercania żywiciela i powodowanie chronicznych infekcji, zapewniających transmisję do naturalnych środowisk. Dokładnie taka jest strategia stosowana przez *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*, które powodują ciągłe biegunki i są zdolne do przeżywania długich okresów czasu w glebie, wodzie itd. *Y. pestis* nie może przeby-

wać poza organizmem gospodarza i jeśli zainfekowana osoba nie zostanie w dość krótkim czasie rozwoju choroby ugryziona przez pchłę, cała populacja pałeczki dżumy biorąca udział w inwazji ginie. Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że transmisja bakterii przez insekta pełniącego rolę wektora jest mało efektywna. Badania wykazały, że liczba bakterii w zainfekowanej krwi potrzebna do skutecznego zakażenia pchły jest nadszeregowa duża ($ID_{50} = 4,8 \times 10^3$), podczas gdy dla podatnych ssaków wynosi 10. Także zagęszczenie pcheł na jednego osobnika w podatnej populacji musi być bardzo duże do podtrzymania epizootycznej epidemii [33]. W rezultacie, w toku mikroewolucji istnieje silna presja w kierunku rozwoju bakteremii o dużym stężeniu komórek na ml krwi, by podnieść prawdopodobieństwo efektywnej transmisji. Pociąga to oczywiście za sobą zwiększenie śmiertelności wśród zakażonych osobników. Strategia taka wydaje się być bardzo ryzykowna i pokazuje jak wielkie znaczenie dla przetrwania pałeczek dżumy ma enzootypne nosicielstwo w populacjach niepodatnych na dżumę ssaków. Ma to również prawdopodobnie pierwszorzędne znaczenie dla pojawiania się nagłych wybuchów epidemii dżumy, które zależą w dużej mierze od stanu populacji pcheł, nosicieli i podatnych żywicieli na danym obszarze [20].

11. Podsumowanie

Postępujący w ostatnich latach rozwój molekularnych metod badawczych oraz narzędzi bioinformatycznych pozwolił na dokładniejszą ocenę filogenetycznego pokrewieństwa bakterii z rodzaju *Yersinia*. Zainteresowanie naukowców tymi patogenami, skupiające się dotychczas na próbach opracowania najbardziej efektywnej szczepionki przeciwko dżumie (wywołanej przez *Y. pestis*), zyskało nowy wymiar wraz z odkryciem bliskiego pokrewieństwa *Y. pestis* z enteropatogennym gatunkiem – *Y. pseudotuberculosis* i poddało w wątpliwość zasadność wyodrębnienia *Y. pestis* jako osobnego gatunku. Zgodnie z obowiązującymi zasadami taksonomicznymi *Y. pestis* mogłaby być uznana za podgatunek *Y. pseudotuberculosis*. Znaczące fenotypowe i ekologiczne różnice (obejmujące m.in. gospodarza, drogi infekcji i proces patogenezy) w konfrontacji z nowymi molekularnymi danymi, wskazującymi na bliskie filogenetyczne związki tych dwóch gatunków, budzą ogromne zainteresowanie. Ten molekularny „paradoks *Yersinia*”, bądź „enigma *Yersinia*” razem z nowymi wynikami badań pozwalającymi na ustalenie czasu wyodrębnienia się *Y. pestis* na 1 500–20 000 lat temu stały się powodem naukowych dociekań na temat gwałtownej ewolucji w obrębie *Yersinia*. Analiza wyników przeprowadzonych dotąd badań zmusza do weryfikacji tradycyjnego przekonania o roli horyzontalnego transferu genów w ewolucji *Y. pestis*. Podwa-

Tabela I

Fenotypowe różnice pomiędzy typowymi szczepami *Y. pestis* (*Y. pe*) i *Y. pseudotuberculosis* (*Y. ps*)

Determinanta	<i>Y. ps.</i>	<i>Y. pe.</i>	Zdarzenie ewolucyjne	Konsekwencje u <i>Y. pestis</i>
pPCP	–	+	Transfer lateralny	Nabycie PlaA – przyśpieszone rozprzestrzenianie w tkankach, degradacja niedostarczonych Yop Nabycie pestycyny – zapewnienie retencji pPCP
pMT1	–	+	Transfer lateralny	Nabycie antygeny F1 – ochrona przed fagocytozą Nabycie Ymt – przetrwanie w jelicie pchły, śmiertelność mysich gospodarzy
Hms ⁺	–	+	Możliwa konstytutywna ekspresja <i>hmsT</i>	Możliwość kolonizacji i blokowania jelita pchły
Obecność łańcuchów O w LPS w 26°C	+	–	Kryptyczne geny R	Konstytutywna oporność na składniki dopełniacza
YadA	+	–	Frameshift	Oslabienie interakcji z powierzchnią komórek gospodarza
Inv	+	–	Insercja IS1541	Oslabienie interakcji z powierzchnią komórek gospodarza
Ail	+	–	Insercja IS285	Oslabienie interakcji z powierzchnią komórek gospodarza
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu	+	–	Mutacja zmiany sensu	Brak cyklu pentozofosforanowego Używanie odwrotnych funkcji transaldolazy i transketolazy lub użycie pentoz gospodarza do syntezy RNA
Aspartaza	+	–	Mutacja missense	Przemiany egzogenne L-glutaminianu w L-asparaginian, obniżenie poziomu czynnika octanu, zwiększone zapotrzebowanie na CO ₂
Biosynteza glicyny i L-treoniny	+	–(rew)	Mutacja w genie hydroksymetylotransferazy serynowej	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Biosynteza L-fenylalaniny	+	–(rew)	Znaczna delecja	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Biosynteza L-metioniny	+	–(rew)	Insercja IS	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Fermentacja ramnozy*	+	–(rew)	Niewielka delecja	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Fermentacja melibiozy*	+	–(rew)	Insercja pary nukleotydów; frameshift	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Ureaza	+	–(rew)	Insercja pary nukleotydów; frameshift	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Asymilacja NH ₄ ⁺ przy niskich stężeniach	+	–(rew)	Mechanizm nieznan	Utrata możliwości pobierania nisko stężonego jonu amonowego; eliminacja niepotrzebnej funkcji

(rew) – spotykane są spontaniczne rewersje do fenotypu *Y. pseudotuberculosis** – fermentacja ramnozy i melibiozy występuje u awirulentnego dla ludzi biotypu *Y. pestis pestoides*

żają one m.in. wagę procesu nabywania dodatkowych plazmidów w rozwoju dżumy i są podstawą do rozważania innych możliwości rozwiązania „paradoksu *Yersinia*”, w tym uwzględnienia, większej niż dotąd zakładano, roli elementów insercyjnych w utracie lub inaktywacji genów. Nie wykluczone, że zmieniony w wyniku mutacji metabolizm *Y. pestis* mógł wzmocnić wirulencję bakterii. Obecność dużej liczby pseudogenów (10% genomu) sugeruje ponadto, że *Y. pestis* znajduje się na wczesnym etapie redukcji genomu.

Piśmiennictwo

- Achtman M., Keim P. i wsp.: Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17837–17842 (2004)
- Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E.: *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14043–14048 (1999)
- Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B.: Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 434–464 (2004)
- Asim *Y. pseudotuberculosis* (*Yersinia*). <http://www.emedicine.com>. (2003).
- Bercovier H., Mollaret H.H., Alonso J.M.: Intra – and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr. Microbiol.* **4**, 225–229 (1980)
- Bottone E.J.: *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 257–276 (1997)
- Brubaker R.R.: The recent emergence of plague: a process of felonious evolution. *Microb. Ecol.* **47**, 293–299 (2004)
- Brzostek K.: Mechanizmy regulacji czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica*. *Post. Mikrobiol.* **43**, 7–38 (2004)
- Carniel E.: The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int. Microbiol.* **2**, 161–167 (1999)
- Chain P.S.G., Garcia E. i wsp.: Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13826–13831 (2004)
- Cohan F.M.: What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 457–487(2002)

12. Cowan C., Jones H.A., Kaya Y.H., Perry R.D., Straley S.C.: Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis*-specific invasin. *Infect. Immun.* **68**, 4523–4530 (2000)
13. Darby S., Hsu J.W., Ghori N., Falkow S.: *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature*, **417**, 243–244 (2002)
14. Deng W., Perry R.D. i wsp.: Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J. Bacteriol.* **184**, 4601–4611 (2002)
15. Drancourt M., Roux V., Dang L.V., Tran-Hung L., Castex D., Chenal-Francisque V., Ogata H., Fournier P.E., Crubezy E., Raoult D.: Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis* and plague pandemics. *Emerging Inf. Dis.* **10**, 1585–1592 (2004)
16. Dykhuizen D.E.: *Yersinia pestis*: an instant species? *Trends Microbiol.* **8**, 296–297 (2000)
17. Forman S.; Wulff C.R., Myers-Morales T., Cowan C., Perry R.D., Straley S.C.: yadBC of *Yersinia pestis*, a new virulence determinant for bubonic plague. *Infect. Immun.* **76**, 578–587 (2008)
18. Foutlier B., Cornelis G., R.: DNA sequence and analysis of the pYVa127/90 virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* strain A127/90. *Res Microbiol.* **154**, 553–7 (2003)
19. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., Tsubokura M., Takeda N., Shubin F.N., Paik I.K., Zheng X.B.: Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3541–47 (2001)
20. Girard J.M., Wagner D.M., Vogler A.J., Keys C., Allender C.J., Drickamer L.C., Keim P.: Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8408–8413 (2004)
21. Górka A., Brzostek K., Hrebenda J.: Białka Yop rodzaju *Yersinia* – mechanizm sekrecji i translokacji. *Post. Mikrobiol.* **38**, 141–162 (1999)
22. Howard S. L., Gaunt M.W., Hinds J., Witney A.A., Stabler R., Wren B.W.: Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J. Bacteriol.* **188**, 3645–53 (2006)
23. Hinnebusch B.J., Rudolph A.E., Cherepanov P., Dixon J.E., Schwan T.G., Forsberg A.: Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science*, **296**, 733–735 (2002)
24. Hinnebusch B.J.: The evolution of flea-borne transmission in *Yersinia pestis*. *Curr Issues. Mol. Biol.* **7**, 197–212 (2005)
25. Hu P., Elliott J., McCready P., Skowronski E., Garnes J., Kobayashi A., Brubaker R.R., Garcia E.: Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **180**, 5192–5202 (1998)
26. Huang X., Lindler L.E.: The pH6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Y. pestis* independent of *Yersinia*-outer proteins and capsule antigen. *Infect. Immun.* **72**, 7212–7219 (2004)
27. Karwicka E., Raczkowska A., Brzostek K.: Mechanizmy sekrecji bakterii Gram-ujemnych – System sekrecji I i III typu. *Post. Mikrobiol.* **45**, 169–182 (2006)
28. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P.: Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3179–3185 (2001)
29. Kolodziejek A.M., Sinclair D.J., Seo K.S., Schneider D.R., Deobald C.F., Rohde H.N., Viall A.K., Minnich S.S., Hovde C.J., Minnich S.A., Bohach G.A.: Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of *Yersinia pestis* KIM. *Microbiol.* **153**, 2941–2951 (2007)
30. Lawrenz M.B., Lenz J.D., Miller V.L.: A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect. Immun.* **77**, 317–26 (2009)
31. Lan R., Reeves P.R.: When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends Microbiol.* **9**, 419–424 (2001)
32. Lerat E., Ochman H.: Recognizing pseudogenes in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3125–3132 (2005)
33. Lorange E.A., Race B.L., Sebbane F., Hinnebusch J.B.: Poor vector competence of fleas and the evolution of hypervirulence in *Yersinia pestis*. *J. Infect. Dis.* **191**, 1907–1912 (2005)
34. Montminy SW, Khan N, McGrath S, Walkowicz MJ, Sharp F, Conlon JE, Fukase K, Kusumoto S, Sweet C, Miyake K, Akira S, Cotter RJ, Goguen JD, Lien E.: Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* **7**, 1066–1073 (2006)
35. Neubauer H., Aleksic S., Hensel A., Finke E.J., Meyer H.: *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 61–4 (2000)
36. Oyston C.F., Isherwood K.E.: *Yersinia*: an update. *Trends Microbiol.* **10**, 550–551 (2002)
37. Parkhill J., Barrell B.G. i wsp.: Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, **413**, 523–527 (2001)
38. Perry R.D., Fetherston J.D.: *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 35–66 (1997)
39. Pourcel C., André-Mazeaud F., Neubauer H., Ramière F., Vergnaud G.: Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* **4**, 22 (2004)
40. Rakin A., Schubert S., Pelludat C., Brem D., Heesemann J.: The high-pathogenicity island of *Yersinia*. W: Kaper J.B., Hacker J. (red), Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. ASM, Washington, D.C. 77–88, (1999)
41. Raoult D., Aboudharam G., Crubezy E., Larrouy G., Ludes B., Drancourt M.: Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12800–12803 (2000)
42. Rudolph A.E., Stuckey J.A., Zhao Y., Matthews H.R., Patton W.A., Moss J., Dixon J.E.: Expression, characterization and mutagenesis of the *Yersinia pestis* murine toxin, a phospholipase D family member. *J. Biol. Chem.* **274**, 11824–11831 (1999)
43. Suomalainen M, Haiko J, Ramu P, Lobo L, Kukkonen M, Westerlund-Wikström B, Virkola R, Lähteenmäki K, Korhonen TK.: Using every trick in the book: the Pla surface protease of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **603**, 268–78 (2007)
44. Trebesius K., Harmsen D., Rakin A., Schmelz J., Heesemann J.: Development of rRNA-targeted PCR and *in situ* hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2557–2564 (1998)
45. Wren B.W.: The *Yersinia* – a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nature Rev. Microbiol.* **1**, 55–64 (2003)
46. Zhou D., Yang R. i wsp.: DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. *J. Bacteriol.* **186**, 5138–5146 (2004)
47. Zhou D., Yang R. i wsp.: Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, Microtus. *J. Bacteriol.* **186**, 5147–5152 (2004)

Magdalena Solarska, Anna Midak-Siewirska, Tomasz Dzieciatkowski*

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2009 r.

1. Wstęp. 2. Adenowirusy. 3. Rotawirusy. 4. Astrowirusy. 5. Kaliciwirusy. 6. Pikornawirusy. 7. Inne wirusy powodujące zaburzenia jelitowe. 8. Metody diagnostyki wirusowych zaburzeń jelitowych. 9. Postępowanie terapeutyczne w przypadku biegunek o etiologii wirusowej. 10. Szczepionki przeciwko wirusom powodującym zaburzenia jelitowe. 11. Podsumowanie

Viruses causing gastroenteritis

Abstract: Acute diarrhea is one of the most common diseases in humans worldwide and viruses are recognized as important causes of this disease, particularly in children. Since the Norwalk virus was identified as a cause of gastroenteritis, the number of viral agents associated with diarrheas in humans has increased steadily. Rotaviruses are one of the most common causes of severe diarrhea in children under 5 years of age. Astroviruses, caliciviruses and enteric adenoviruses are also important etiologic agents of acute gastroenteritis. Other viruses, such as entero-, corona- and herpesviruses, are increasingly being identified as causative agents of diarrhea, especially in immunocompromised persons. In recent years, the availability of diagnostic tests, mainly based on immunoassays or molecular biology techniques, has increased our understanding of this group of viruses. The development of safe and highly effective vaccines – as made against rotavirus – could prevent cases of severe diarrhea and reduce mortality from this disease.

1. Introduction. 2. Adenoviruses. 3. Rotaviruses. 4. Astroviruses. 5. Caliciviruses. 6. Picornaviruses. 7. Other viruses causing gastroenteritis. 8. Diagnostics of viral diarrhea. 9. Therapeutic proceedings. 10. Prevention and prophylaxis against viral gastroenteritis. 11. Summary

Słowa kluczowe: adenowirusy, rotawirusy, biegunki wirusowe

Key words: adenoviruses, rotaviruses, viral diarrhea

1. Wstęp

Ostre biegunki o etiologii wirusowej są jednym z najczęściej występujących zakażeń ludzi na całym świecie i wciąż pozostają jedną z najważniejszych przyczyn śmierci dzieci w wieku do 5 lat [21]. W grupie tej notowano ponad 700 milionów przypadków biegunek wirusowych rocznie, z których 3–5 milionów kończy się zejściem śmiertelnym [58]. Większość z nich ma miejsce w krajach rozwijających, gdzie istotnymi czynnikami są: niedożywienie, niski poziom higieny, zanieczyszczona woda oraz brak podstawowej opieki zdrowotnej [24]. Wirusowe zakażenia przewodu pokarmowego stanowią również problem u pacjentów z obniżoną odpornością, np. w wyniku immunosupresji po przeszczepach [18], a także w przebiegu zakażenia HIV [16, 39].

Pierwsze podejrzenia wirusów jako czynników etiologicznych zaburzeń ze strony układu pokarmowego datują się na lata czterdzieste ubiegłego wieku [32]. Jednak ich bezpośredni udział pozostawał niewyjaśniony do czasu badań K a p i k i a n a, który w 1972 roku jako pierwszy wyizolował wirusa (określonego później jako wirus Norwalk) z próbek kału pobranych w trakcie epidemii biegunki w Stanach Zjednoczo-

nych [31]. W rok później B i s h o p wykrył obecność rotawirusów w błonie śluzowej dwunastnicy u dzieci z zaburzeniami ze strony układu pokarmowego [9], a w roku 1975 stwierdzono obecność astrowirusów [41] i jelitowych szczepów adenowirusów w kale dzieci z ostrą biegunką [47].

Wraz z zastosowaniem nowych metod badawczych ilość rodzin wirusów powiązanych z ostrymi zaburzeniami jelitowymi wciąż wzrasta. Wprowadzenie do diagnostyki metod biologii molekularnej, niezbędne zwłaszcza w badaniach osób poddanych immunosupresji, pozwoliło na przypisanie roli w wywoływaniu biegunek kolejnym wirusom – należącym do korona- czy enterowirusów [5, 11].

2. Adenowirusy

Adenowirusy należą do wirusów bezotoczkowych, których materiałem genetycznym jest dwuniciowe liniowe DNA o wielkości 33–40 tys. par zasad. Do chwili obecnej zidentyfikowano 51 ich serotypów, które podzielono na 6 grup (oznaczonych literami A-F) opierając się na składzie i organizacji DNA, właściwościach hemaglutacyjnych oraz potencjalnej

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny; ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel. (22) 622 00 28; e-mail: dzieciatkowski@wp.pl

Tabela I

Wirusy powodujące zakażenia żołądkowo-jelitowe

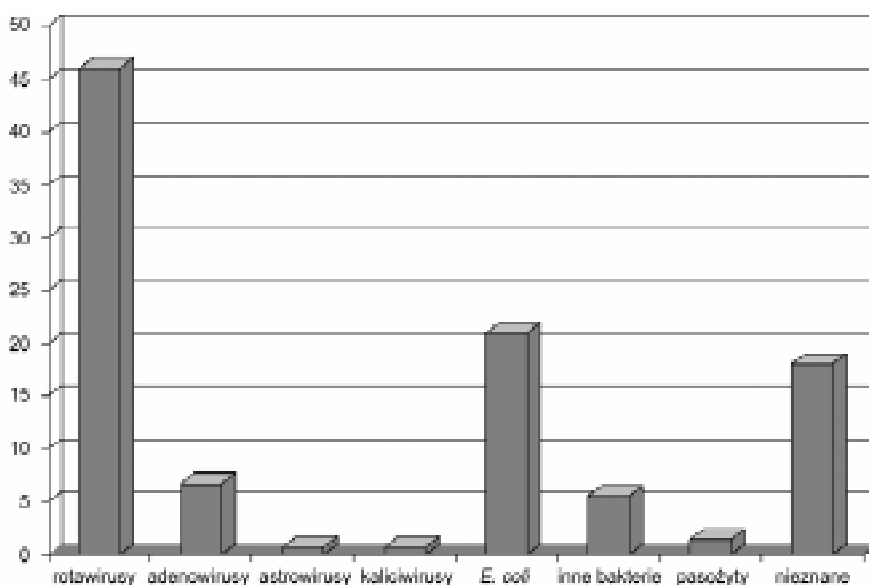
Rodzina wirusów	Wirus	Typ kwasu nukleinowego	Droga przenoszenia	Zasięg występowania
<i>Adenoviridae</i>	HAdV-40, -41	ds DNA	fekalno-oralna, rzadko przez wodę	cały świat
<i>Reoviridae</i>	Rotavirus A Rotavirus B Rotavirus C	ds RNA	fekalno-oralna	cały świat Azja, Afryka Ameryka Płd.
<i>Astroviridae</i>	HAsV	ss (+) RNA	przez wodę, fekalno-oralna	cały świat
<i>Caliciviridae</i>	Norwalk Sapporo	ss (+) RNA	fekalno-oralna	cały świat cały świat
<i>Picornaviridae</i>	HPeV-1, -2 Aichi	ss (-) RNA	fekalno-oralna	cały świat Japonia

onkogenności wobec zwierząt [6]. Za zakażenia układu pokarmowego odpowiedzialne są głównie wirusy z grupy F, do której zaliczono tylko dwa adenowirusy HAdV-40 i -41 [37, 64], choć sporadycznie izoluje się z próbek kału także HAdV-1, -3, -7 oraz 31 [35].

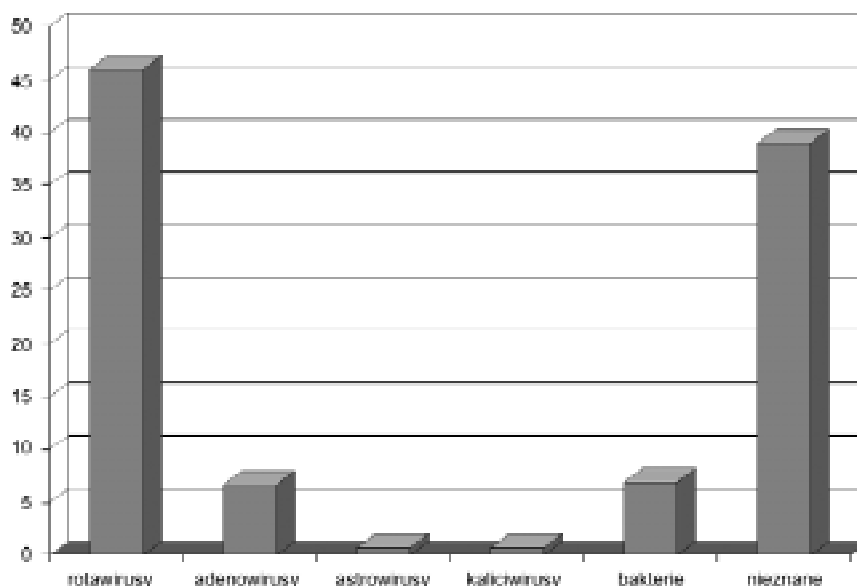
Adenowirusy są jednym z najczęstszych czynników etiologicznych poważnych zakażeń przewodu pokarmowego wśród niemowląt i małych dzieci poniżej 5 roku życia. Wirusy należące do grupy F są rozpowszechnione we wszystkich rejonach świata i wykrywane w 4 do 15% próbek kału pobranych od dzieci z zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi [10] – zajmują więc pod względem częstości wywoływania tych schorzeń drugie miejsce po rotawirusach. Przeciwciała przeciwko nim są wykrywane u ok. 50% dzieci poniżej 5 roku życia w Azji, Europie i Ameryce Południowej. EAds (Enteric Adenoviruses) mają związek z przedłużającą się biegunką u niemowląt, mogącą doprowadzić do odwodnienia i niedożywienia dziecka.

Zazwyczaj po okresie inkubacji trwającym 8–10 dni pojawia się biegunka, której towarzyszy niewysoka gorączka, wymioty, bóle brzucha i odwodnienie [43]. Przebieg choroby jest łagodny, samoustępujący i zazwyczaj nie wymaga leczenia. Sezonowa zapadalność na biegunki o etiologii adenowirusowej jest taka sama wśród chłopców i dziewczynek. Częstość zapadania na biegunkę spowodowaną przez adenowirusy wśród dzieci karmionych mlekiem matki wynosi 19,2%, w przeciwieństwie do niemowląt karmionych pokarmem sztucznym 47,8%, co dowodzi, że otrzymywanie przez dziecko przeciwciał matczynych może być wystarczające do zapobiegnięcia zakażeniu [43].

Biegunki adenowirusowe dotyczą głównie dzieci do 2 roku życia, bowiem u większości pacjentów w wieku do lat 4 wykrywane są przeciwciała skierowane przeciwko HAdV-40/41 [35]. Stolce są zazwyczaj wodniste, bez krwawych podbiegnięć. Ilość dziennych wypróżnień może sięgać 15, choć zazwyczaj jest



Rys.1 Udział procentowy czynników etiologicznych powodujących biegunki na świecie u pacjentów pediatrycznych [22, 32].



Rys.2 Udział procentowy czynników etiologicznych powodujących biegunki na świecie u osób dorosłych [22, 32]

mniejsza. Biegunka wywołana przez adenowirusy trwa najczęściej do 11 dni, zauważalnie dłużej od choroby wywołanej przez rotawirusy [35]. Typowa dla jej przebiegu jest także gorączka oraz wymioty. W przeciwieństwie do zakażeń rotawirusami rzadkie są infekcje w obrębie jednej rodziny.

Zakażenia układu pokarmowego wywołane przez enterotropowe szczepy adenowirusów są zazwyczaj łagodne, z tendencjami do samoograniczenia. Możliwe są jednak przypadki ciężkie, które prowadzą do zejść śmiertelnych – dotyczą one głównie pacjentów poddanych immunosupresji [18, 28] i osób z AIDS [16]. Zakażenia w tej grupie pacjentów może przebiegać bezobjawowo, lub pełnoobjawowo ze znacznie ostrzejszym przebiegiem niż u osób immunokompetentnych. Pacjenci pediatryczni po zabiegach transplantacyjnych są trzykrotnie bardziej narażeni na zakażenia niż dorośli, a śmiertelność w tej grupie sięga aż 83% [18].

3. Rotawirusy

Jedną z najczęstszych przyczyn biegunek u niemowląt i małych dzieci do 5 roku życia są zakażenia spowodowane przez rotawirusy, należące do rodziny *Reoviridae*. Wykazują one zdolność zakażenia różnych gatunków ssaków, jednak różnice antygenowe jakimi cechują się poszczególne szczepy sprawiają, że do zakażenia człowieka typami zwierzęcymi dochodzi niezwykle rzadko [19]. Genom rotawirusów składa się z 11 segmentów podwójnej nici RNA, który otoczony jest przez konserwatywne białko VP6. Obecnie, opierając się na obecności i strukturze antygeny białkowe-

go VP6, rotawirusy podzielono na 7 grup głównych oznaczonych A-G, z których patogenne dla człowieka są trzy pierwsze [1]. Najbardziej rozpowszechniona i o największej patogenności jest grupa A, w obrębie której wydzielono dodatkowo 4 podgrupy [4].

Biegunki o etiologii rotawirusowej zazwyczaj powodują ciężkie odwodnienie i niedożywienie chorych, a w ciężkich przypadkach mogą doprowadzić nawet do ich śmierci. W skali światowej każdego roku umiera z tego powodu ok. 500 000 pacjentów pediatrycznych, co szacowane jest na 5% ogólnej liczby zgonów wśród tej grupy wiekowej. W krajach rozwiniętych 1/40 dzieci jest hospitalizowanych z powodu zakażenia rotawirusowego przed ukończeniem 5 roku życia [19, 54]. Najwyższy poziom zakażeń notuje się pomiędzy 3 a 15 miesiącem życia, a 95% dzieci minimum raz przechodzi zakażenie omawianym patogenem przed ukończeniem 5 miesiąca. Interesującą jest obserwacja, iż najmniej niemowląt choruje przed ukończeniem 12 tygodni, co tłumaczone jest przekazywaniem przeciwciał ochronnych wraz z mlekiem matki [4, 19].

Zakażenia rotawirusowe wśród dzieci w przeciwieństwie do dorosłych, wykazują sezonowość zachorowań. Dorośli mający kontakt z chorymi dziećmi należą do grupy osób o największym stopniu ryzyka. Najczęściej transmisja wirusa zachodzi między członkami rodziny. Tego typu zakażenia występują również na oddziałach pediatrycznych [4]. U dorosłych infekcja najczęściej przebiega subklinicznie, zakażenia pełnoobjawowe zostały zanotowane wśród dorosłych żyjących w dużych zgrupowaniach (np. rekruci). Rotawirusy w ok. 9% są czynnikiem etiologicznym biegunek podróży (zajmują drugie miejsce za entero-

toksycznymi szczepami *Escherichia coli*), szczególnie wśród osób odwiedzających takie miejsca jak Wyspy Kanaryjskie czy Ameryka Centralna [1]. Kolejnym źródłem zakażeń rotawirusowych jest personel medyczny. Również obecność pacjentów z obniżoną odpornością, u których występuje długotrwałe wydzielanie wirusa może być źródłem zakażeń w szpitalu [1, 53].

Rotawirusy rozprzestrzeniają się z człowieka na człowieka drogą fekalno-oralną lub też przez kontakt bezpośredni, zanieczyszczone przedmioty, czy zanieczyszczony pokarm. Atakują nabłonek walcowaty na szczycie kosmyków jelitowych w dwunastnicy i górnym odcinku jelita krętego, a zniszczenie tych komórek zaburza prawidłowe wchłanianie pokarmów [19]. Zwykle po replikacji cytolitycznej w dojrzałych enterocytach jelita cienkiego, nowe cząsteczki wirusa zakażają kolejne, odległe części jelita cienkiego i/lub są wydalane do kału w ilości 10^{10} – 10^{11} cząsteczek wirusa na 1 gram kału podczas infekcji u dzieci. Ilość cząsteczek wydzielanych przez dorosłych może być bardzo różna, wynosząca 10–100 razy mniej niż u dzieci [27]. Bezobjawowe, subkliniczne zakażenie najczęściej występujące u dorosłych, przebiega z tak małym wydzielaniem wirusa, że ilość ta jest niewykrywalna przez komercyjne testy diagnostyczne. Dowiedziono, że dojrzałe komórki nabłonka są w czasie infekcji zastępowane przez niedojrzałe enterocyty, które wykazują mniejszą wrażliwość na zakażenie rotawirusem. Cechują się one jednak obniżoną aktywnością enzymatyczną, a co za tym idzie mniejszym wchłanianiem wody, cukrów i jonów [19, 27].

Okres inkubacji rotawirusów trwa 1–3 dni, a symptomy zakażenia są bardzo różne, począwszy od bezobjawowego zakażenia do wodnistej biegunki. Ustąpienie objawów choroby zależy w dużej mierze od statusu immunologicznego chorego. Najwyższe stężenie IgA przeciw rotawirusom występuje pomiędzy 14–17 dniem po infekcji i pozostaje wykrywalne przez ponad rok, ulegając stopniowej redukcji [1, 19]. Korelacja jaka zachodzi między układem immunologicznym a zakażeniem wirusowym nie jest w pełni poznana. Zarówno przeciwciała surowicze, jak i śluzówkowe biorą prawdopodobny udział w ochronie przed infekcją. Antygeny VP7 i VP4 odgrywają kluczową rolę w mobilizacji układu immunologicznego [15]. Pierwsze przeciwciała pojawiające się podczas infekcji wykazują powinowactwo do jednego typu wirusa, charakteryzując się jednocześnie ograniczoną zdolnością do reakcji krzyżowych. Osoby w podeszłym wieku, u których układ humoralny i odpowiedź komórkowa są obniżone, wydalają wiriony potomne przez 35 dni, podczas gdy zdrowi dorośli przez 10 dni. Podobne obserwacje poczyniono u dorosłych nosicieli HIV-1, gdzie często występuje chroniczna biegunka połączona ze stałym wydalaniem niewielkich ilości rotawirusów [1].

4. Astrowirusy

Pierwsze doniesienia na temat wykrycia nowej rodziny *Astroviridae* [48] i powiązania jej z występowaniem epidemii biegunek oraz wymiotów pochodzą z połowy lat 70-tych ubiegłego wieku [2]. Nazwa całej rodziny pochodzi od struktury kapsomerów, które kształtem przypominają gwiazdki [48]. Materiał genetyczny stanowi jednoniciowe RNA o dodatniej polarności. Do chwili obecnej znanych jest 7 serotypów ludzkich astrowirusów [67], z czego serotypy 1–5 mają największe znaczenie. Astrowirusy cechują się opornością na niskie pH, więc podczas transmisji drogą fekalno-oralną soki żołądkowe nie hamują ich dalszego przemieszczania do jelita cienkiego, gdzie wirusy ulegają namnożeniu w enterocytach [56].

Znaczenie epidemiologiczne wywołwanego przez astrowirusy zapalenia układu pokarmowego, nie było pewne w czasach gdy ich obecność można było wykrywać tylko metodą mikroskopii elektronowej, przez co ilość przypadków biegunki i nudności powodowanych przez te patogeny była znacznie zaniżona. Infekcje astrowirusowe są najczęstszymi biegunkami po rotawirusowych w okresie późnej zimy i wczesnej wiosny [57]. Zakażenia mogą wystąpić w każdej grupie wiekowej, chociaż częściej u niemowląt i małych dzieci [64]. W badaniach seroepidemiologicznych wykazano, iż u 70% starszych dzieci i młodych dorosłych występowały przeciwciała przeciw astrowirusom. Do obserwowanych objawów należą biegunka, wymioty, gorączka i bóle brzucha [65]. Są one jednak łagodniejsze w porównaniu objawami wywołanymi przez inne wirusy [49] i stanowią 2–10% zakażeń biegunkowych [56, 57, 65] – co jest porównywalne z infekcjami adenowirusami typu 40/41. Na masowe przypadki infekcji tym patogenem można w szczególności natknąć się w przedszkolach, szkołach, szpitalach i domach starców oraz nieco rzadziej u rekrutów. Zarażenie następuje na drodze zjedzenia skażonej żywności (w szczególności ostryg), oraz na drodze fekalno-oralnej poprzez wodę. Astrowirusy mogą być wydalane przez pacjenta nawet dłużej niż tydzień od momentu zakażenia. Sporadycznie u pacjentów pediatrycznych spotyka się wodnistą biegunkę, bez wymiotów i gorączki [67]. Opisywana też jest wysoka częstotliwość *gastroenteritis* o etiologii *Astroviridae* u pacjentów z obniżoną odpornością, włączając w to nosicieli HIV i chorych na AIDS [39, 57] oraz pacjentów poddanych immunosupresji po zabiegach transplantacyjnych, zwłaszcza w obrębie układu pokarmowego [56]. Zakażenia astrowirusowe zazwyczaj ulegają samowyleczeniu [48, 67], a w literaturze charakteryzowane są jako „samoograniczające” biegunki [56]. Jednakże w przypadku małych dzieci istotne jest leczenie objawowe obejmujące podawanie płynów i uzupełnianie elektrolitów [57].

5. Kaliciwirusy

Do rodziny tej zaliczane są wirusy patogenne dla człowieka oraz zwierząt, zaś nazwa pochodzi od charakterystycznych wgłębień na powierzchni wirionu mających kształt kielichów [61]. Najważniejszymi przedstawicielami rodziny *Caliciviridae* z punktu widzenia patogenności dla człowieka, są sapowirusy [52] oraz norowirusy [71], a wśród nich wirus Norwalk, który swą nazwę zawdzięcza miejscowości w amerykańskim stanie Ohio, gdzie wykryto go po raz pierwszy jako czynnik etiologiczny zapalenia żołądka i jelit u uczniów jednej z tamtejszych szkół [45, 71].

Wszystkie wirusy należące do rodziny *Caliciviridae* mają symetrię ikosahedralną; ich kapsyd zawiera prawie wyłącznie kopie jednego białka strukturalnego a materiał genetyczny stanowi pojedyncza nić RNA o dodatniej polarności [61]. Do chwili obecnej żadnego z przedstawicieli tej rodziny nie daje się hodować w warunkach *in vitro*. Są one źródłem zarówno masowych zachorowań, jak i pojedynczych infekcji układu pokarmowego u przedstawicieli wszystkich grup wiekowych. Są jednak na tyle zróżnicowane, że na podstawie analiz filogenetycznych, że zostały podzielone na 5 genogrup, zawierających 29 genotypów. Dotychczas w Genogrupie 1 (GG1) wyróżniono 8 genotypów, które są patogenami człowieka, natomiast w Genogrupie 2 (GG2) wyróżniono ich 17. Pozostałe 4 genotypy zostały rozdzielone pomiędzy Genogrupami od 3 do 5 [71].

Sezon zimowy sprzyja licznym zakażeniom wirusowym przewodu pokarmowego, zatem i zakażenia kaliciwirusami występują wtedy częściej [40]. Kaliciwirusy przenoszone są drogą fekalno-oralną [45]; do zakażeń dochodzi za pośrednictwem wody, pokarmów, odchodów, ale też przez lotny materiał zakaźny. Zakażenia mogą wystąpić ogniskowo, jako związane ze zbiorowym żywieniem, czy skażoną wodą; możliwe jest też zakażenie bezpośrednio od osoby chorej. Patogeneza choroby związana jest z atrofią kosmków jelita cienkiego [45], a wykonane biopsje wykazały nasilenie apoptozy w nabłonku i blaszce właściwej. Wirusy wykryto w jelicie czczym i/lub krętym, niekiedy także w dwunastnicy [46]. Objawami, które dodatkowo towarzyszą infekcji są bóle brzucha, biegunka i wymioty [10].

Objawy kliniczne nie pozwalają określić z jakim wirusem mamy do czynienia – są to na ogół silne nudności, wymioty i biegunka. Okres inkubacji waha się między 6 a 48 godzin, jednak w niektórych przypadkach może trwać do 60 godzin. 100 cząsteczek wirusa potrafi (mimo bardzo niewielkiej dawki) wywołać w pełni efektywny rozwój wirusa w organizmie człowieka oraz dalsze zakażenia w obrębie populacji. Ponieważ wirus jest usuwany z organizmu razem z ka-

łem i wymiocinami, należy pamiętać iż możliwe jest zakażenie na drodze fekalno-oralnej z powodu tworzących się aerozoli biologicznych. Z paroma wyjątkami, rozprzestrzenianie się wirusów kończy się po 2 tygodniach. Możliwa jest jednak reinfekcja, gdyż układ odpornościowy nie jest w stanie obronić się przed tak zróżnicowanym genetycznie i antygenowo patogenem jakim są norowirusy [3].

Zakażenia przewodu pokarmowego o etiologii kaliciwirusowej występują głównie u dzieci [40, 46, 52]. Odsetek zakażeń przewodu pokarmowego kaliciwirusami wynosi 6–14% [10, 46]. U pacjentów po zabiegach transplantacji jelita cienkiego i wątroby był on wyraźnie wyższy i wynosił ok. 38% [46]. Częstsze zakażenia mają też miejsce u pacjentów HIV-pozytywnych, zwłaszcza dzieci. Dorośli zarówno zakażeni, jak i nie zakażeni, HIV mają jednakowe szanse na infekcję kaliciwirusową. Nie stwierdzono jednak istotnego związku pomiędzy wirusowymi infekcjami przewodu pokarmowego, a występowaniem biegunek u osób z HIV [52]. Norowirusy mogą brać udział w zakażeniach mieszanych wraz z innymi wirusami [40].

W przypadku *gastroenteritis* o etiologii kaliciwirusowej stosuje się leczenie objawowe obejmujące podawanie płynów. Jak dotąd nie ma szczepionki, chroniącej przed zapaleniem żołądka i jelit powodowanego przez kaliciwirusy [3].

6. Pikornawirusy

W skład rodziny *Picornaviridae* wchodzi wiele ważnych patogenów ludzi i zwierząt, które cechują niewielkie wymiary, brak otoczki oraz jednoniciowy RNA jako nośnik informacji genetycznej [59]. Ze względu na właściwości serologiczne oraz organizację kwasu nukleinowego wyróżniono dziewięć gatunków pikornawirusów [33]. Za wywołanie biegunek odpowiedzialne są najczęściej parechowirusy (ludzki parechowirus typu 1 – HPeV-1 oraz typu 2 – HPeV-2), zaliczane do gatunku oznaczonego numerem szóstym, a poprzednio klasyfikowane jako echowirus 22 i echowirus 23 [60]. HPeV-1 i HPeV-2 są często izolowane z przypadków zaburzeń jelitowych u dzieci [17], jednak wykazano również ich udział w neuroinfekcjach w tej samej grupie wiekowej [36]. W badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych w Finlandii wykazano, że wśród pacjentów poniżej 12 miesiąca życia specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko parechowirusom występują u 20% badanych. Z wiekiem częstość ta wzrasta aż do 97% w grupie osób powyżej 18 roku życia [30].

Kolejnym czynnikiem etiologicznym należącym do pikornawirusów jest wirus Aichi, odkryty pod koniec lat 90-tych w prefekturze Aichi w Japonii, gdzie

wywołał epidemię biegunki wśród dzieci w wieku przedszkolnym (<6 roku życia). Początkowo sądzono, że zakażenie zostało wywołane przez znane dotychczas parechowirusy, lecz dokładne badania serologiczne i molekularne spowodowały wyodrębnienie go jako nowego typu pikornawirusa [69].

7. Inne wirusy wywołujące zaburzenia jelitowe

Oprócz wirusów wymienionych powyżej rodzin, sporadycznie zaburzenia żołądkowo-jelitowe powodują także inne patogeny subkomórkowe. Jednym z nich są torowirusy zaliczane do rodziny *Coronaviridae* [26, 42]. Zaczęto je wiązać z biegunkami ludzi w połowie lat 70 [20], jednak ich rola pozostawała wówczas nie do końca poznana. Udział torowirusów w etiologii biegunek u pacjentów pediatrycznych został potwierdzony jednoznacznie dopiero w 1984 roku [5], a obecnie wykrywa się je również u osób poddanych immunosupresji [29, 34]. Z kolei, zakażenia herpeswirusami, takimi jak CMV czy EBV, są jedną z najczęstszych przyczyn zaburzeń jelitowych u pacjentów z niedoborami immunologicznymi, zwłaszcza u biorców przeszczepów i osób z AIDS [22, 51, 70]. Biegunka spowodowana przez cytomegalowirusa była spotykana szczególnie często u chorych w przebiegu AIDS z liczbą limfocytów CD4 poniżej 100 komórek/mm³ [8, 68], jednak powszechne zastosowanie skojarzonej terapii przeciwwirusowej znacząco zredukowało liczbę zachorowań w tej grupie pacjentów [22].

8. Metody diagnostyki wirusowych zaburzeń jelitowych

Zakażenia wirusami biegunkowymi mogą być diagnozowane przy użyciu mikroskopii elektronowej [50], immunomikroskopii elektronowej, metod serologicznych, takich jak EIA [50] czy ELISA [14], jak również za pomocą technik biologii molekularnej, takich jak RT-PCR [14, 40] oraz hybrydyzacja RNA typu dot-blot [44]. Należy jednak rozważyć zasadność użycia określonej metody w konkretnych przypadkach. Z przeprowadzonych badań wynika bowiem, że EIA jest metodą czulszą w porównaniu z mikroskopią elektronową [50] i immunomikroskopią elektronową [44]. Natomiast metodą hybrydyzacji RNA wirusowego można wykryć wysokie rozcieńczenia materiału genetycznego wirusa. Mimo to, do rutynowej diagnostyki w przypadku dużej liczby próbek poleca się raczej metody immunoenzymatyczne, jako prostsze i o wystarczającej czułości. Natomiast hybrydyzacja może być niezwykle przydatna jako test potwierdzający niejednoznaczne wyniki uzyskane metodą EIA [44].

Materiał, który może być użyty do badań to oprócz próbek kału, materiał z biopsji jelita, gdy zachodzi potrzeba badań histopatologicznych [50]. Autorzy sięgają po coraz bardziej wysublimowane testy diagnostyczne, takie jak ICC-RT-PCR (integrated cell culture-reverse transcription-PCR) – nested PCR, wskazując również potrzebę badania wód powierzchniowych w kierunku zakażeń wirusami, między innymi astrowirusami upatrując w nich źródło zakażeń [13]. Do rutynowej diagnostyki jednak stosowane są komercyjne testy oparte na wykrywaniu antygenów metodami immunochromatograficznymi lub przez aglutynację laktosową. Wyniki prawidłowo dodatnie uzyskiwane są z próbek, w których miano wirusów wynosi 10⁴–10⁷ na gram kału. Ilość wyników fałszywie ujemnych szacuje się na 3–5%. Przy podejrzeniu biegunki wirusowej wskazana jest także jednoczesna diagnostyka w poszukiwaniu bakteryjnego czynnika etiologicznego, a wykrycie wirusów w badanym materiale klinicznym uzasadnia przerwanie dalszych badań bakteriologicznych, co zmniejsza koszty diagnostyczne.

9. Postępowanie terapeutyczne w przypadku biegunek o etiologii wirusowej

Brak specyficznego leku działającego na wirusy biegunkowe powoduje, że nawadnianie poprzez podawanie płynów i elektrolitów pozostaje głównym sposobem leczenia zakażonych pacjentów. Nieliczne badania wykazują skuteczność podawania probiotyków, które skracają czas trwania biegunki [23, 25, 63]. Dzieci karmione mlekiem matki posiadają inną florę fizjologiczną, niż te karmione sztucznym pokarmem, przez co ciężkie biegunki występują u nich rzadziej. Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że u dzieci którym podawano preparaty *Lactobacillus*, stwierdzano mniejszą ilość biegunek w porównaniu z grupą kontrolną [12, 23, 63]. Ponadto wykazano redukcję ilości zakażeń rotawirusowych oraz nasilenia ich przebiegu u pacjentów, którym podawano *Bifidobacterium bifidum* i *S. thermophilus* [25, 62]. W zakażeniach dzieci o ciężkim nasileniu można podawać loperamid, kodeinę czy difenoksyilat, jako leki hamujące biegunki [1]. Pewne działanie na rotawirusy wykazuje nitazoxanid – pochodna tiazolidowa – skuteczna w zakażeniach o etiologii *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* i *Clostridium difficile* [38, 54]. Aktywność leku zależy prawdopodobnie od pierścienia salicylowego [38]. Badania laboratoryjne zostały potwierdzone badaniami klinicznymi, z których wynika, że dzieci którym podawano lek miały biegunkę trwającą do 31 godzin, podczas gdy pacjenci z grupy kontrolnej cierpieli na tę dolegliwość 75 godzin. U osób biorących udział w badaniu nie wykryto koinfekcji innymi

patogenami. Prawdopodobnie użycie leku będzie jednak ograniczone wyłącznie do dzieci nieszczepionych [38] oraz jako leczenie empiryczne w ciężkich przypadkach ze względu na podobieństwo objawów zakażenia rotawirusami oraz kryptosporidiozy [54].

10. Szczepionki przeciwko wirusom powodującym zaburzenia jelitowe

Szczepienia przeciwko wirusom biegunkowym mają za zadanie chronić przed umiarkowanym i ciężkim zakażeniem (nie przed lekkim) oraz zmniejszyć liczbę dzieci trafiających do szpitala z powodu odwodnienia. Z tego powodu jest ona potrzebna przede wszystkim w krajach rozwijających.

Wszystkie zarejestrowane do tej pory szczepionki przeciwko rotawirusom są żywe, podawanie doustnie, co ma maksymalnie naśladować zakażenie szczepem dzikim [66]. Pierwsza monowalentna szczepionka została wprowadzona na rynek w latach 70. ubiegłego wieku. Szczepy te były pochodzenia zwierzęcego (bydłęce, małpie), przez co charakteryzowały się naturalną atenuacją wobec ludzi. Zostały wycofane ze względu na niezadowalające efekty [66].

Rotawirusy wykazują zdolność reassortacji *in vitro* w zakażeniach mieszanych, co zostało wykorzystane w rekombinacji szczepionek. Aby uzyskać takie szczepy linie komórkowe zakażane są dwoma różnymi szczepami wirusa, zwierzęcym i ludzkim zawierającym gen kodujący VP7. Następnie wirusy ulegają replikacji, a wiriony potomne są genetyczną kombinacją dwóch wyjściowych wirusów. Reassortny wirus zawiera część genów pochodzenia ludzkiego szczepu i część zwierzęcego. Antygeny VP7 i VP4 odgrywają istotną rolę w immunizacji, dlatego reassortna szczepionka ludzko-zwierzęca zawiera geny kodujące VP7 lub VP4 zapewniając uzyskanie odpowiedzi immunologicznej. Pierwsza reassortna szczepionka była czterowalentna, zawierała antygeny ludzkiego rotawirusa G1-4, oraz szczep małpi. Została zarejestrowana w 1998 roku USA i podawana była dzieciom w 2, 4 i 6 miesiącu życia. Po 9 miesiącach od wprowadzenia na rynek została wycofana, gdyż jako efekt niepożądany po jej podaniu występowało wgłębienie jelita (najczęściej 3–10 dnia po podaniu pierwszej dawki). Mechanizm patologiczny tego zjawiska nadal pozostaje nieznany [15, 26]. W 2006 została zarejestrowana pięciowalentna, żywa reassortna szczepionka, w skład której wchodzi antygeny ludzkich rotawirusów G1-G4 i białko kotwiczące P7 pochodzenia bydłowego. Piąty reassortny wirus zawiera białko kotwiczące ludzkiego szczepu i białko zewnętrzne G6 pochodzące ze szczepu bydłowego. Trzy dawki szczepionki powinny być podawane pomiędzy 6 (minimalny wiek dla podania pierwszej

dawki) a 32 (maksymalny wiek dla podania trzeciej dawki) tygodniem życia w odstępach co 2 miesiące (w 2, 4, 6, miesiącu życia) [15, 27]. Nie ma wskazań do rozpoczynania szczepienia u dzieci powyżej 12 tygodnia życia. Po trzech dawkach efektywność szczepionki chroniąca przed zakażeniem szczepem dzikim wynosi 74% przed ciężkim zapaleniem przewodu pokarmowego, definiowanym jako obfita biegunka z towarzyszącą wysoką temperaturą i wymiotami u 98% przypadków. Karmienie piersią nie jest przeciwwskazaniem do podania szczepionki, dlatego takie dzieci powinny być szczepione zgodnie z wytycznymi. Szczepionka przeciw rotawirusom może być podawana równocześnie z innymi szczepionkami wieku dziecięcego takimi jak: DTa, IPV, HiB, PCV, WZW typu B. Przeciwwskazaniem do szczepienia jest uczulenie dziecka na którykolwiek składnik szczepionki [7, 66].

Dostępna do 2001 roku szczepionka przeciwko adenowirusom zapobiegała wyłącznie zakażeniom dróg oddechowych i zawierała żywe wiriony – z tego też powodu nie było możliwe stosowanie jej u pacjentów poddanych immunosupresji. Nie eliminowała także zagrożenia ze strony adenowirusów biegunkowych należących do podgrupy F, które są największym zagrożeniem dla dzieci. W 1971 roku została wprowadzona na rynek amerykański szczepionka doustna zawierająca żywy, nieatenuowany wirus, serotypów 4 i 7 (grupa E i B). Niespecyficzne namnażenie wirusów w komórkach nabłonka jelita cienkiego nie powodowało objawów chorobowych, a skutkowało wytworzeniem specyficznej odpowiedzi humoralnej [55]. Ze względu na liczne działania niepożądane oraz brak możliwości jej stosowania u osób z niedoborami immunologicznymi, została ona wycofana z użycia. Do chwili obecnej brak jest nowoczesnych i bezpiecznych w użyciu szczepionek podjednostkowych, zwłaszcza skierowanym przeciwko wariantom biegunkowym AdV40 i 41, niezwykle istotnym z pediatrycznego punktu widzenia [55].

11. Podsumowanie

Objawy kliniczne w przebiegu wszystkich biegunek o etiologii wirusowej są zbliżone do siebie, niezależnie od wywołującego je czynnika. Najczęściej obserwuje się liczne, wodniste stolce, wymioty, bóle brzucha z towarzyszącą podwyższoną ciepłotą ciała. Objawy te pojawiają się kilkanaście godzin po pierwszym kontakcie z osobą chorą lub po spożyciu zakażonego pokarmu. W diagnostyce różnicowej, prócz testów serologicznych, pomocne może być też stwierdzenie czasu zachorowania. Do zakażeń rotawirusami, norowirusami oraz sapowirusami dochodzi bowiem w miesiącach zimowych, zakażenia astrowirusami mają najczęściej

Tabela II

Charakterystyczne cechy kliniczne najczęściej występujących biegunek o etiologii wirusowej

Rodzina wirusów	Sezonowość (szczyt zachorowań)	Okres inkubacji	Wymioty	Gorączka	Zakażenia szpitalne
<i>Adenoviridae</i>	brak	8–10 dni	+	++	+
<i>Reoviridae</i>	zimowo-wiosenna	1–3 dni	+++	++	+++
<i>Astroviridae</i>	wiosienno-letnia	24–36 h	+	+	+
<i>Caliciviridae</i>	jesiennie-zimowa	6–48 h	++	++	++
<i>Picornaviridae</i>	brak	12–24 h	+	+	+

miejsce od marca do czerwca, zaś zakażenia adenowirusami zdarzają się przez cały rok. Przebieg choroby i czas utrzymywania się jej objawów zależą zarówno od rodzaju i dawki zakażającej wirusa, a także od wydolności immunologicznej organizmu zakażonego. Duże zróżnicowanie antygenowe poszczególnych szczepów wirusów odpowiedzialnych za wywołanie objawów dyspeptycznych powoduje, iż choroby te nie pozostawiają trwałej odporności.

Rozpoznanie czynników etiologicznych ostrych biegunek wirusowych ma znaczenie przede wszystkim epidemiologiczne i powinno służyć rozwojowi systemu wczesnego powiadamiania o zagrożeniu chorobą oraz wdrożeniu działań profilaktycznych. Do chwili obecnej w Polsce została jedynie dość dobrze rozpoznana sytuacja epidemiologiczna zakażeń spowodowanych przez rotawirusy; brak jest natomiast danych dotyczących zakażeń innymi wirusami biegunkowymi.

Literatura

- Anderson E.J., Weber S.G.: Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 91–99 (2004)
- Appleton H., Higgins P.G.: Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*, **7919**, 1297 (1975)
- Atmar R.L., Estes M.K.: Norwalk viruses and related caliciviruses causing gastroenteritis. [w:] *Clinical virology*. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (red.) ASM Press, Washington 2002, s. 1041–1060.
- Bass E.S., Pappano D.A., Humiston S.G.: Rotavirus. *Pediatr. Rev.* **28**, 183–191 (2007)
- Beards G.M., Brown W.G., Green J., Flewett T.H.: An enveloped virus in stools of children and adults with gastroenteritis that resembles de Breda virus of calves. *J. Med. Virol.* **20**, 67–78 (1986)
- Benkó M., Harrach B., Both G.W., Russell W.C., Adair B.M., Ádám E., de Jong J.C., Hess M., Johnson M., Kajon A., Kidd A.H., Lehmkuhl H.D., Li Q.-G., Mautner V., Pring-Akerblom P., Wadell G.: Family Adenoviridae, [w:] *Virus taxonomy. VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (red.), Academic Press, New York, N.Y. 2004, s.1162.
- Bernstein D.I.: Live attenuated human rotavirus vaccine, Rotarix. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **17**, 188–194 (2006)
- Bini E., Cohen J.: Diagnostic yield and cost-effectiveness of endoscopy in chronic human immunodeficiency virus related diarrhea. *Gastrointest. Endosc.* **48**, 354–361 (1998)
- Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J.: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, **7841**, 1281–1283 (1973)
- Bon F., Facia P., Dauvergne M., Tenenbaum D., Planon H., Petion A.M., Pothier P., Kohli E.: Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3055–3058 (1999)
- Caul E.O.K., Paver K., Clarke S.K.R.: Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis. *Lancet*, **7917**, 1192 (1975)
- Chandra R.K.: Effect of Lactobacillus on the incidence and severity of acute rotavirus diarrhea in infants. A prospective placebo-controlled double-blind study. *Nutrition Research*, **22**, 65–69 (2002)
- Chapron C.D., Ballester N.A., Fontaine J.H., Frades C.N., Margolin A.B.: Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2520–2525 (2000)
- De Bruin E., Duizer E., Vennema H., Koopmans P.G.: Diagnosis of norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J. Virol. Methods*, **137**, 259–264 (2006)
- Dennehy P.H.: Rotavirus vaccines – an update. *Vaccine*, **25**, 3137–3147 (2007)
- Dionisio D., Arista S., Vizzi E., Manneschi L.I., Di Lollo S., Trotta M., Sterrantino G., Mininni S., Leoncini F.: Chronic intestinal infection due to subgenus F type 40 adenovirus in a patient with AIDS. *Scand. J. Infect. Dis.* **29**, 305–307 (1997)
- Ehrnst A., Eriksson M.: Epidemiological features of type 22 echovirus infection. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**, 275–281 (1993)
- Forrest G.: Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **20**, 16–21 (2004)
- Franco M.A., Greenberg H.B.: Rotaviruses. [w:] *Clinical virology*. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (red.) ASM Press, Washington 2002, s. 743–762.
- Glass R.I.: Other viral agents of gastroenteritis. [w:] *Infections of the gastrointestinal tract*. Blaser M.J., Smith P.D., Raudin J.I., Greenberg H.B., Guerrant R.L. (red.) Raven Press, New York 1995, s. 1055–1064.
- Glass R.I., Kilgore P.E.: Etiology of acute viral gastroenteritis. [w:] *Diarrheal disease*. Gracey M., Walker J.A. (red.) Lippincott-Raven, Philadelphia 1997, s. 38–54.
- Goodgame R.W.: Viral causes of diarrhea. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* **30**, 779–795 (2001)

23. Guarino A., Lo Vecchio A., Canani R.B.: Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **25**, 18–23 (2009)
24. Guerrant R.L., Hughes J.M., Lima N.L., Crane J.: Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev. Infect. Dis.* **12**, S41–50 (1990)
25. Heczko P.B., Strus M., Jawień M., Szymański H.: Medyczne zastosowanie probiotyków. *Wiad. Lek.* **58**, 640–646 (2005)
26. Holmes K.V., Lai M.M.C.: Coronaviridae: the viruses and their replication. [w:] *Virology*. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (red.) Lippincott-Raven, Philadelphia 1996: s. 1075–1093.
27. Hyser J.M., Estes M.K.: Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **25**, 36–43 (2009)
28. Jalal H., Bibby D.F., Tang J.W., Bennett J., Kyriakou C., Peggs K., Cubitt D., Brink N.S., Ward K.N., Tedder R.S.: First reported outbreak of diarrhea due to adenovirus infection in a hematology unit for adults. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2575–2580 (2005)
29. Jamieson F., Wang E.I., Bain C., Good J., Duckmanton L., Petric M.: Human torovirus: a new nosocomial gastrointestinal pathogen. *J. Infect. Dis.* **178**, 1263–1269 (1998)
30. Joki-Korpela P., Hyypia T.: Diagnosis and epidemiology of echovirus 22 infections. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 129–136 (1998)
31. Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanock R.M.: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* **10**, 1075–1081 (1972)
32. Kapikian A.Z.: Overview of viral gastroenteritis. *Arch. Virol.* **12**, S7–19 (1996)
33. King A.M.Q., Brown F., Christian P.: Picornaviridae. [w:] *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B. (red.) Academic Press, San Diego 2000, s. 657–673.
34. Koopmans M.P., Goosen E.S., Lima A.A., McAuliffe I.T., Nataro J.P., Barrett L.J., Glass R.I., Guerrant R.L.: Association of torovirus with acute and persistent diarrhea in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **16**, 504–507 (1997)
35. Kotloff K.L., Losonsky G.A., Morris J.G. Jr, Wasserman S.S., Singh-Naz N., Levine M.M.: Enteric adenovirus infection and childhood diarrhea: an epidemiologic study in three clinical settings. *Pediatrics*, **84**, 219–225 (1989)
36. Koskiniemi M., Paetau R., Linnavuori K.: Severe encephalitis associated with disseminated echovirus 22 infections. *Scand. J. Infect. Dis.* **21**, 463–466 (1989)
37. Krajden M., Brown M., Petrasko A., Middleton P.J.: Clinical features of adenovirus enteritis: a review of 127 cases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**, 636–641 (1990)
38. Lanata C.F., Franco M.: Nitazoxanide for rotavirus diarrhea. *Lancet*, **9530**, 100–101 (2006)
39. Liste M.B., Natera I., Suarez J.A., Pujol F.H., Liprandi F., Lubert J.E.: Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2873–2877 (2000)
40. Liu C., Grillner L., Jonsson K., Linde A., Shen K., Lindell A.T., Wirgart B.Z., Johansen K.: Identification of viral agents associated with diarrhea in young children a winter season in Beijing, China. *J. Clin. Virol.* **35**, 69–72 (2006)
41. Madeley C.R., Cosgrove B.P.: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*, **7932**, 451–452 (1975)
42. McIntosh K.: Coronaviruses. [w:] *Principles and practice of infectious diseases*. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (red.) Churchill Livingstone, Philadelphia 2000: s. 1767–1770.
43. Modarres S., Jam-Afzon F., Modarres S.: Enteric adenoviruses infection in infants and young children with acute gastroenteritis in Tehran. *Acta. Med. Iran.* **44**, 349–353 (2006).
44. Moe C.L., Allen J.R., Monroe S.S., Gary, Jr. H.E., Humphrey C.D., Hermann J.E., Blacklow N.R., Carcamo C., Koch M., Kim K-H., Glass R.I.: Detection of astrovirus in pediatric stool samples by immunoassay and RNA probe. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2390–2395 (1991)
45. Moreno-Espinosa S., Farkas T., Jiang X.: Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **15**, 237–245 (2004)
46. Morotti R.A., Kaufman S.S., Fishbein T.M., Chatterjee N.K., Fuschino M.E., Morse D.L., Magid M.S.: Calicivirus infection in pediatric small intestine transplant recipients: pathological considerations. *Hum. Pathol.* **35**, 1236–1240 (2004)
47. Morris C.A., Flewett T.H., Bryden A.S., Davies H.: Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet*, **7897**, 4–5 (1975)
48. Moser L.A., Schultz-Cherry S.: Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunol.* **18**, 4–10 (2005)
49. Olesen B., Neimann J., Böttiger B., Ethelberg S., Schiellerup P., Jensen C., Helms M., Scheutz F., Olsen K.E.P., Krogfelt K., Petersen E., Mflbak K., Gerner-Schmidt P. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3636–3641 (2005)
50. Otsu R., Ishikawa A., Mukae K.: Detection of small round structured viruses in stool specimens from outbreaks of gastroenteritis by electron microscopy and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Virol.* **44**, 53–55 (2000)
51. Pirsch J.: Cytomegalovirus infection and posttransplant lymphoproliferative disease in renal transplant. Results of the US multicenter Kidney Transplant Study Group. *Transplantation*, **68**, 1203–1205 (1999)
52. Rodriguez-Guillen L., Vizzi E., Alcalá A.C., Pujol F.H., Liprandi F., Lubert J.E. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J. Clin. Virol.* **33**, 104–109 (2005)
53. Rogers M., Weinstock D.M., Eagan J., Kiehn T., Armstrong D., Sepkowitz K.A.: Rotavirus outbreak on a pediatric oncology floor: possible association with toys. *Am. J. Infect. Control*, **28**, 378–380 (2000)
54. Rossignol J.F., Abu-Zekry M., Hussein A., Santoro M.G.: Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhea: randomized double-blind placebo controlled trial. *Lancet*, **9530**, 124–129 (2006)
55. Ruuskanen O., Meurman O., Akusjärvi G.: Adenoviruses. [w:] *Clinical virology*. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (red.) ASM Press, Washington 2002, s. 515–535.
56. Sebire N.J., Malone M., Shah N., Anderson G., Gaspar H.B., Cubitt W.D. Pathology of astrovirus associated diarrhea in a pediatric bone marrow transplant recipient. *J. Clin. Pathol.* **57**, 1001–1003 (2004)
57. Seetulsingh P., Collier S.: Neonatal astrovirus gastroenteritis during an inborn nursery outbreak. *J. Hosp. Infect.* **64**, 196–197 (2006)
58. Snyder J.D., Merson M.H.: The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull. WHO*, **60**, 605–631 (1982)
59. Stanway G.: Structure, function and evolution of picornavirus. *J. Gen. Virol.* **71**, 2483–2501 (1990)

60. Stanway G., Hyypia T.: Parechoviruses. *J. Virol.* **73**, 5249–5254 (1999)
61. Strauss J.H., Strauss E.G.: Family Caliciviridae. [w:] *Viruses and human disease*. Strauss J.H., Strauss E.G. (red.) Academic Press, San Diego 2002, s. 71–74.
62. Sullivan A., Nord C.E.: The place of probiotics in human intestinal infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **20**, 313–319 (2002)
63. Szymański H., Pejcz J., Jawień M.: Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains – a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol. Ther.* **23**, 247–253 (2006)
64. Uhnoo I., Wadell G., Svensson L., Johansson M.E.: Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 365–372 (1984)
65. Utagawa E.T., Nishizawa S., Sekine S., Hayashi Y., Ishihara Y., Oishi I., Yamashita I., Miyamura K., Yamazaki S., Inouye S., Glass R.I.: Astrovirus as a cause of gastroenteritis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1841–1845 (1994)
66. Vesikari T.: Rotavirus vaccines. *Scand. J. Infect. Dis.* **40**, 691–695 (2008)
67. Walter J.E., Mitchell D.K.: Astrovirus infection in children. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**, 247–253 (2003)
68. Weber R., Ledergerber B., Zbinden R., Altwegg M., Pfyffer G.E., Spycher M.A., Briner J., Kaiser L., Opravil M., Meyenberger C., Flepp M.: Enteric infections and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons: prospective community-based cohort study. *Arch. Intern. Med.* **159**, 1473–1480 (1999)
69. Yamashita T., Sugiyama M., Tsuzuki H., Sakae K., Suzuki Y., Miyazaki Y.: Application of a polymerase chain reaction for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2955–2961 (2000)
70. Yuen K.Y., Woo P.C., Liang R.H., Chiu E.K., Chen F.F., Wong S.S., Lau Y.L., Ha S.Y., Peiris J.S., Siau H., Chan T.K.: Clinical significance of alimentary tract microbes in bone marrow transplant recipients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 75–81 (1998)
71. Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., Beard R.S., Glass R.I., Monroe S.S.: Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, **346**, 312–323 (2006)

Paulina Godzik*

Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny,
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2008

1. Wstęp. 2. Zwierzęce modele badawcze wirusa zapalenia wątroby typu C. 3. Pierwsze próby stworzenia systemu replikacji HCV. 4. Replikacja subgenomowego RNA HCV. 5. Replikacja pełnogenomowego RNA HCV *in vitro* oraz tworzenie zakaźnych cząstek wirusowych. 6. Podsumowanie

***In vitro* hepatitis C virus (HCV) replication system**

Abstract: Infection with hepatitis C virus, a major cause of chronic liver diseases, is a serious worldwide health problem. The number of infected individuals has been estimated at around 170 millions. More than 80% of patients develop a persistent infection, which can be asymptomatic for many years. Despite increasing knowledge about the virus replication and pathogenesis, there is still no vaccination and successful antiviral therapy. Problems with the development of efficient drugs against HCV are connected with the lack of tissue culture or small animal models for HCV. Since HCV discovery in 1989, the development of a cell culture system for HCV has been a major goal for scientists worldwide. Due to difficulties in creating a robust cell culture model based on full-length HCV genome, Lohmann et al. and other independent groups established subgenomic replicons, which replicated in hepatoma cell line. Results of these experiments extended knowledge about HCV RNA replication. The next goal was to construct a cell culture system, which could produce virus particles. Wakita et al. created the first tissue culture that led to the production of HCV particles (2a genotype), which were infectious for both cells and chimpanzees. It was a major breakthrough in investigations on the efficiency of new vaccines and antivirals. However, the genotype 2a is not representative of the genotype 1 HCV, which is the most prevalent and typically associated with liver diseases. Therefore, there is a need to create a robust cell culture system for HCV genotype 1.

1. Introduction. 2. Animal models for hepatitis C virus. 3. First attempts to create a HCV replication system. 4. Replication of subgenomic HCV RNA. 5. *In vitro* replication of full-length HCV RNA genome and production of infectious virus particles. 6. Summary

Słowa kluczowe: hodowla komórkowa, replikacja, replikon, wirus zapalenia wątroby typu C (HCV)

Key words: cell culture, hepatitis C virus (HCV), replication, replicon

1. Wstęp

Wirusowe zapalenie wątroby typu C stanowi globalny problem zdrowotny. Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) u około 80% chorych przechodzi w zakażenie przewlekłe, którego skutkiem może być włóknienie, marskość wątroby i rak wątrobowo-komórkowy [23]. Szacuje się, iż na świecie jest 170 mln osób zakażonych HCV [7, 35]. Nie ma dokładnych danych dotyczących epidemiologii tego wirusa wśród populacji polskiej. Dostępne są jedynie informacje dotyczące wybranych grup ryzyka. Częstość występowania anty-HCV wśród kandydatów na dawców krwi wynosi 0,86% [32]. Wysokie rozpowszechnienie przeciwciał anty-HCV odnotowuje się u osób, które co najmniej raz przyjmowały narkotyk pod postacią iniekcji, 60% [30] oraz osób dializowanych, 23–44% [29].

HCV należy do rodziny *Flaviviridae*, jest wirusem osłonkowym i zawiera materiał genetyczny pod postacią nici RNA o dodatniej polarności. Pojedyncza otwarta ramka odczytu (ORF) koduje polipeptynę, z której na skutek kotranslacyjnego oraz potranslacyjnego dzia-

łania komórkowych i wirusowych proteaz generowanych jest 10 białek. Wśród nich występują białka strukturalne: białko rdzenia, białka osłonki (E1, E2), p7 oraz białka niestrukturalne, nazwane odpowiednio NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A oraz NS5B. ORF oflanowana jest niezwykle konserwatywnymi regionami, które nie ulegają translacji – NTRs (nontranslated regions) [9]. 5' NTR zawiera sekwencję IRES (internal ribosome entry site) niezbędną w procesie translacji polipeptyny [5,14].

Izolaty HCV charakteryzują się dużym zróżnicowaniem pod względem sekwencji. Uważa się, iż wynika to z niskiej wierności i braku funkcji naprawczych RNA-zależnej polimerazy RNA (NS5B). Znanych jest 6 głównych genotypów HCV oraz kilkadziesiąt podtypów. Zróżnicowanie to wpływa na szereg cech wirusa. Genotyp 1 jest najbardziej rozpowszechniony na świecie i zakażenie tym genotypem najczęściej prowadzi do uszkodzeń wątroby oraz nowotworów [4, 11, 41]. Różnice występują również w odpowiedzi na terapię antywirusową. Pacjenci zakażeni genotypami 1, 4, 5 i 6 zdecydowanie gorzej odpowiadają na leczenie

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 022 849 79 17; pgodzik@pzh.gov.pl

interferonem niż chorzy z genotypami 2 i 3 [41, 42]. Biorąc pod uwagę te fakty system replikacji HCV w liniach komórkowych (system replikacji *in vitro*) oparty na materiale genetycznym genotypu 1, powinien mieć największe znaczenie w prowadzeniu badań nad terapią antywirusową.

2. Zwierzęce modele badawcze HCV

Mimo wielu badań nie udało się stworzyć skutecznej szczepionki oraz standardów leczenia, które dawałyby satysfakcjonujące rezultaty. Eksperymenty są utrudnione ze względu na brak odpowiedniego modelu zwierzęcego do badań. Jedynymi zwierzętami, u których dochodzi do zakażenia HCV są szympansy. Przeprowadzanie badań na małpach wiąże się z jednej strony z bardzo dużymi kosztami, a z drugiej strony obarczone jest problemami etycznymi. Dlatego prowadzono eksperymenty w celu uzyskania myszy, które ulegałyby zakażeniu przez HCV. Mercer wraz ze swoim zespołem, korzystając z transgenicznych gryzoni (SCID-mouse; severe combined immunodeficient mice), stworzył myszy posiadające chimeryczne wątroby zbudowane z ludzkich oraz mysich hepatocytów. Po zakażeniu tych zwierząt HCV wykrywano w wątrobie wirusowe RNA [25]. Jednak ze względu na fakt, iż myszy były pozbawione prawidłowo działającego układu odpornościowego, nie mogły one służyć jako model do badań nad szczepionką, czy nową terapią antywirusową [26].

W 1989 roku Choo i wsp. przy pomocy metod biologii molekularnej zidentyfikowali HCV. Udało się tego dokonać poprzez analizę biblioteki cDNA, skonstruowanej na podstawie RNA wyizolowanego z surowicy pacjenta chorego na wirusowe zapalenie wątroby typu nie-A, nie-B [8]. Od tego czasu prowadzone są badania nad stworzeniem wzorcowego modelu hodowli komórkowej, umożliwiającej namnażanie wirusa *in vitro*. Możliwość replikacji HCV w linii komórkowej pozwoliłaby na pogłębienie wiedzy na temat cyklu replikacyjnego wirusa, interakcji patogenu z komórkami oraz na sprawdzenie skuteczności potencjalnych związków antywirusowych. Ostatni aspekt badań jest niezwykle ważny, gdyż obecnie stosowana terapia przeciw HCV oparta na podawaniu pegylowanego interferonu i rybawiryny jest skuteczna jedynie u około 50% pacjentów, a ponadto prowadzi do wielu działań niepożądanych [36, 40].

3. Pierwsze próby stworzenia systemu replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C

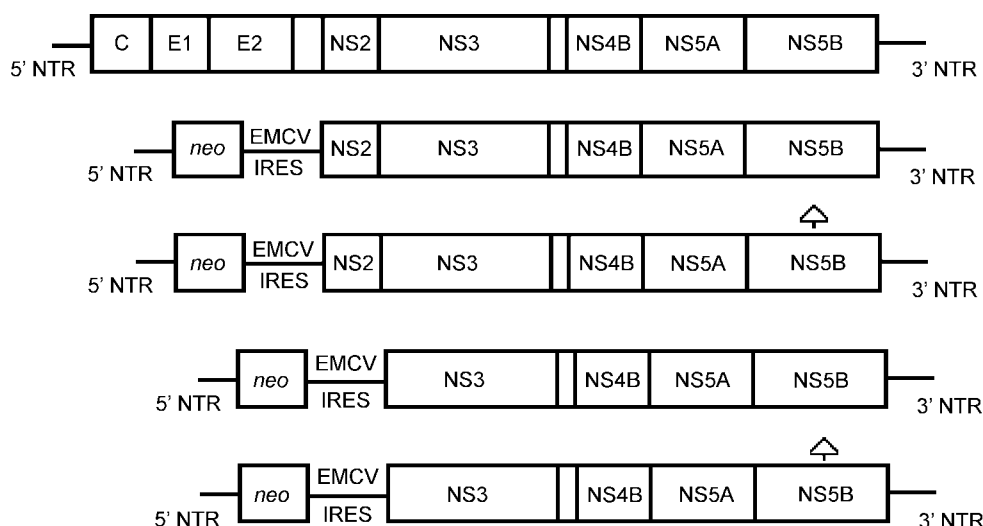
Pierwsze badania, które posłużyły do stworzenia systemu replikacji HCV w liniach komórkowych, polegały na stworzeniu infekcyjnego cDNA wirusa. Ekspe-

ryment ten został wykonany w 1997 roku przez dwie niezależnie pracujące grupy badawcze [19, 37]. Genom wirusa (o genotypie 1a) nazwany 'H77', został wyizolowany z surowicy zakażonych pacjentów, następnie przepisany na cDNA przy pomocy odwrotnej transkrypcji i wklonowany w odpowiedni wektor plazmidowy. Plazmidy zawierające pełnej długości HCV cDNA (pCV-H77), zostały zlinearyzowane poprzez cięcie enzymem restrykcyjnym i posłużyły jako matryca do przeprowadzonej *in vitro* transkrypcji z zastosowaniem T7 RNA polimerazy. Tak przygotowanym materiałem zakażano szympansy, poprzez bezpośrednią iniekcję do wątroby. Żaden z klonów H77 nie był zakaźny [37]. Opierając się na wynikach tych badań Chung i wsp. zmodyfikowali konstrukt pCV-H77 dodając na końcu 3' genomu H77 rybozym wirusa delta (hepatitis D virus) oraz terminator T7 wirusa krowianki, zaś na końcu 5' promotor T7. Konstrukty następnie były transfekowane do dwóch linii komórkowych: HepG2 i CV-1. Replikacja miała zachodzić przy udziale dodanej do zakażonej hodowli zrekombinowanej polimerazy T7. Jednak wynik pozytywny (replikację wirusa HCV) uzyskano jedynie w przypadku hodowli CV-1 [10].

Badania nad replikacją wirusa HCV z wykorzystaniem konstruktów zawierających pełnogenomowe cDNA H77 były prowadzone w różnych ośrodkach, jednak żadne z nich nie dawały satysfakcjonujących wyników [2, 20]. Replikacja HCV zachodziła na bardzo niskim poziomie i nie udało się zaadaptować hodowli komórkowej tak, aby otrzymać wysoki poziom replikacji wirusa [12]. Należy pamiętać o tym, iż badanie replikacji wirusa przy pomocy technik RT-PCR w tego typu eksperymentach jest niezwykle skomplikowane ze względu na obecność dużych ilości DNA plazmidowego, które posłużyły do transfekcji komórek [26].

4. Replikacja subgenomowego RNA wirusa zapalenia wątroby typu C

Ze względu na małą efektywność replikacji pełnogenomowego RNA wirusa w liniach komórkowych, podejmowano próby tworzenia replikonów zawierających subgenomowe RNA [1, 15, 16, 24, 27]. Lohmann i wsp. jako pierwszy stworzył subgenomowy replikon, który replikował się w linii komórkowej Huh-7 (hepatoma cell line). Jako materiał wyjściowy do stworzenia konstruktów posłużyło RNA o genotypie 1b, wyizolowane z wątroby pacjenta przewlekle zakażonego HCV. Przy pomocy reakcji RT-PCR przepisano na cDNA i namnożono całą ORF wirusa. Ze względu na istotną rolę sekwencji 3' i 5' NTR w procesie replikacji, zostały one zamplifikowane w dwóch oddzielnych



Rys. 1. Schemat przedstawiający sekwencje subgenomowego replikonu HCV. Pierwszy schemat przedstawia organizację genu HCV, zaś cztery kolejne to bicystronowe replikony (opis w tekście).

reakcjach RT-PCR, tak aby zapobiec utracie końcowych nukleotydów podczas reakcji łańcuchowej polimeryzacji. Na podstawie namnożonych fragmentów stworzono cztery bicystronowe plazmidy zawierające różne warianty sekwencji wirusowych (Rys. 1). Wszystkie rozpoczynały się od sekwencji 5' HCV-IRES, genu *neo* (kodującego fosfotransferazę neomycyny), EMCV-IRES oraz sekwencji HCV (odpowiednio w dwóch wariantach rozpoczynając od NS2 lub NS3 do autentycznego końca 3' RNA), z wprowadzoną delecją w obrębie NS5B oraz bez delecji. Po przepisaniu sekwencji na RNA, transfekowano nim komórki Huh-7, a następnie hodowlę prowadzono z dodatkiem neomycyny. IRES wirusa zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (EMCV) umożliwiał bezpośrednią translację wirusowej polipeptydy, zaś obecność genu *neo* nadawała oporność na neomycynę komórkom, w którym dochodziło do replikacji i translacji replikonu HCV. Wyniki eksperymentu L o h m a n n a były obiecujące, uzyskano klony odporne na neomycynę, co świadczyło o zachodzącej replikacji sekwencji wirusowych. W przypadku zastosowania do transfekcji konstruktów z delecją w genie NS5B uzyskiwano zdecydowanie mniejszy poziom replikacji niż w przypadkach bez mutacji. Ponadto, nie zauważono różnic w zdolności namnażania replikonów z sekwencją kodującą NS2 oraz bez niej, co wykluczyło rolę białka NS2 w procesie replikacji HCV [24]. W uzyskanych liniach komórkowych, replikację sekwencji wirusowych wykrywano nawet po roku prowadzenia ciągłej hodowli pod presją antybiotyku. Wydaje się, iż można mówić o wysokiej stabilności tych replikonów [27].

Doświadczenia wykonane przez L o h m a n n a i wsp. zapoczątkowały eksperymenty prowadzące do udoskonalenia metod replikacji materiału genetyczne-

go HCV *in vitro*. Wyniki tych badań nie tylko dały nadzieję na stworzenie metodyki replikacji całego genu HCV, ale również udowodniły możliwość zastosowania tego typu doświadczeń w poznawaniu cyklu replikacyjnego wirusa oraz funkcji poszczególnych białek. Poważnym ograniczeniem tej metody był brak możliwości tworzenia cząsteczek wirusowych, ze względu na brak sekwencji kodujących białka strukturalne w obrębie replikonu.

A l i i wsp. zaobserwował replikację subgenomowego RNA w linii komórkowej HEK 293 (Human Embryonic Kidney), transfekowanej wcześniej przy pomocy bicystronowego replikonu stworzonego przez L o h m a n n a [1, 24]. Wynik tych badań zasugerował możliwość replikacji genu HCV w różnych rodzajach komórek, co ma istotne znaczenie między innymi ze względu na sposób leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu C. Już wcześniej badania polsko-amerykańskiej grupy naukowców potwierdziły replikację HCV w innych komórkach niż hepatocyty (komórki jednojądrowe krwi obwodowej, szpiku kostnego, tkanki mózgowej oraz wiele innych), natomiast nie udało się dokonać replikacji *in vitro* RNA wirusa w innej niż hepatoma (rak wątrobowokomórkowy) linii komórkowej [21]. Pod tym względem eksperyment A l i' e g o był przełomowy. Kontynuowane przez niego badania pozwoliły na zaobserwowanie istotnych zmian w skuteczności hamowania replikacji replikonu HCV w liniach Huh-7 i HEK 293 po zastosowaniu interferonu alfa. Stężenie IFN- α , które w 50% hamowało replikację wirusa w przypadku linii HEK 293 było aż 14 razy większe niż w Huh-7 [1]. Wynik ten oraz fakt, iż RNA HCV ulega replikacji w różnych komórkach, potwierdziły sens prowadzenia badań nad replikacją oraz jej inhibicją w różnych liniach komórkowych.

Ze względu na zróżnicowanie HCV pod względem genotypów, badania nad replikacją RNA w liniach komórkowych prowadzone były również w kierunku tworzenia subgenomowych replikonów na podstawie RNA o innych genotypach niż opisany powyżej 1b [15, 16]. Brak możliwości utworzenia efektywnego systemu replikacyjnego z wykorzystaniem całego cDNA genotypu 1a [2, 10, 19, 20, 37] nie zniechęcił naukowców do pracy nad subgenomowym replikonem. W 2003 roku Gu i wsp. utworzył subgenomowy replikon z zastosowaniem materiału genetycznego szczepu H77 (genotyp 1a) [15]. Schemat eksperymentu był bardzo podobny do tego, który przeprowadził Lohmann w 1999 roku [24]. Konstruktor zawierał 5' HCV IRES, gen *neo*, EMCV IRES oraz sekwencje wirusowe począwszy od NS3 do końca 3' NTR. Jako kontrolę zastosowano konstruktor zawierający analogiczne sekwencje genotypu 1b. Po przeprowadzonej *in vitro* transkrypcji, powstałe RNA elektroporowano do linii Huh-7 i prowadzono hodowlę z dodatkiem neomycyny. W przypadku genotypu 1a replikacja nie zachodziła. Wydaje się, iż nie dochodziło do translacji RNA wirusowego i tworzenia białek wirusowych niezbędnych w procesie replikacji [15]. Dalsze doświadczenie pozwoliły na wysunięcie hipotezy, iż pierwsze 200 nukleotydów sekwencji NS3 genotypu 1a może tworzyć drugorzędową strukturę uniemożliwiającą przyłączenie rybosomów do EMCV IRES [16]. Z tego powodu Gu podjął próbę stworzenia chimericznych replikonów 1a-1b. Zmienił swój konstruktor poprzez zamianę 75-nukleotydowej sekwencji kodującej N-terminalny region NS3 na odpowiadającą temu fragmentowi sekwencję genotypu 1b. Po elektroporacji do linii Huh-7 i hodowli z dodatkiem neomycyny udało się uzyskać replikację sekwencji wirusowych. Mimo wszystko replikacja w przypadku genotypu 1a była kilkakrotnie słabsza niż w przypadku 1b. Poziom białka NS5B (RNA zależnej polimerazy RNA) był 5–10 razy mniejszy, kiedy do elektroporacji zastosowano chimeryczny replikon [15]. Gu i wsp. kontynuowali swoją pracę w kierunku sprawdzenia i porównania efektywności interferonu alfa w inhibicji replikacji obu replikonów. Okazało się, iż replikony kodujące polimerazę genotypu 1a były mniej wrażliwe na działanie interferonu. Wyniki tych badań potwierdzają znany fakt, iż genotypy HCV w różny sposób reagują na terapię antywirusową [39, 42].

5. Replikacja pełnogenomowego RNA wirusa zapalenia wątroby typu C *in vitro* oraz tworzenie zakaźnych cząstek wirusowych

Pomimo, iż nie udało się stworzyć systemu replikacji HCV *in vitro* na podstawie pełnogenomowego RNA 'H77', naukowcy nie przestali prowadzić badań

w kierunku replikacji innego pełnogenomowego genotypu wirusa [6, 22, 34, 38, 39, 44]. W 2005 roku pojawiło się pierwsze doniesienie o udanej próbie replikacji całego genomu HCV w linii komórkowej [34]. Jako materiał genetyczny wirusa posłużyło RNA genotypu 2a (JFH1 – Japanese Fulminant Hepatitis) wyizolowane od japońskiego pacjenta z piorunującym zapaleniem wątroby. Przepisany na cDNA pełnej długości RNA został wklonowany w plazmid. Produkt przeprowadzonej *in vitro* transkrypcji został transfekowany do linii Huh-7. Wyniki tego eksperymentu były zaskakujące. Już po 24 godzinach hodowli wykrywano w komórkach obecność pełnogenomowego JFH1, zaś po 72 godzinach w 70–80% komórek obecność białka rdzeniowego oraz białek niestrukturalnych wirusa. Świadczyło to o wysokim poziomie replikacji w komórkach transfekowanych przy pomocy JFH1. W supernatancie pochodzonym z hodowli znajdowane były, przy zastosowaniu technik mikroskopii elektronowej, cząstki wirusowe o średnicy około 55nm, czyli wielkością nie odbiegające od cząstek HCV opisywanych w piśmiennictwie [33]. Cząstki te były zakaźne zarówno w stosunku do linii Huh-7, jak i szympanсів. Eksperyment Wakit'y i wsp. był pierwszą udaną próbą przeprowadzenia replikacji HCV *in vitro* z uzyskaniem zakaźnych cząstek wirusowych. Ponadto posłużył do potwierdzenia wysuwanej wcześniej hipotezy, iż CD81 uczestniczy we wnikaniu wirusa do komórki [13, 28, 31, 43]. Zastosowanie swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko CD81 hamowało zakaźność JFH1 w stosunku do linii Huh-7 [34]. Zhong i wsp. kontynuował badania z zastosowaniem przeciwciał. Inkubował JFH1 z przeciwciałami anti-E2, a następnie zakażał nimi komórki linii Huh-7. W komórkach tych obserwowano 5 razy mniejsze stężenie HCV RNA, niż w komórkach kontrolnych, zakażonych JFH1 [44]. Potwierdziło to wcześniejsze przypuszczenia, iż interakcja białka E2 z CD81 jest kluczowa w procesie wnikania wirusa do komórek [13, 28, 31, 43].

Dalsze eksperymenty pozwoliły na uzyskanie linii komórkowej zawierającej zintegrowany z genomem pJFH1. Przy pomocy technik inżynierii genetycznej zintegrowano cDNA HCV z genomem komórek linii Huh-7. W ten sposób uzyskano linię komórkową, która w stabilny sposób produkowała cząstki wirusowe. Ich zdolność do infekcji była hamowana przez zastosowanie monoklonalnych przeciwciał przeciw CD81 oraz E2. Cai i wsp. udowodnili również hamujący wpływ interferonu alfa na replikację pełnogenomowego RNA HCV z konstruktów cDNA zintegrowanego z genomem komórki, co potwierdziło skuteczność terapii interferonem w przypadku zakażenia genotypem 2a [6].

Ze względu na wspomniane już zróżnicowanie HCV pod względem genotypów, podejmowano próby stworzenia systemu replikacji opartego na pełnogeno-

mowych RNA o różnych genotypach [3, 17, 18, 22]. Ciekawe wyniki uzyskał Lindénbach po stworzeniu chimerycznych pełnogenomowych replikonów. Zamieniono sekwencje kodujące białka strukturalne oraz białko NS2 w JFH1 na odpowiadające temu sekwencje genotypu 1a (H77). Uzyskaną chimerę transfekowano do linii Huh-7. Replikon 1a/2a replikował się w komórkach, natomiast powstałe w ten sposób cząstki wirusowe nie były zakaźne *in vitro*. Wyniki te zasugerowały, iż pomiędzy sekwencjami kodującymi strukturalne i niestrukturalne białka mogą zachodzić interakcje niezbędne do utworzenia prawidłowo działającego systemu replikacji HCV *in vitro* [22].

W 2006 roku pojawiło się doniesienie o możliwości produkcji cząstek zakaźnych genotypu 1a HCV w linii Huh-7 [39]. Miało to olbrzymie znaczenie ze względu na duże rozpowszechnienie tego genotypu wśród osób zakażonych HCV oraz większą tolerancję na leczenie interferonem w porównaniu z innymi genotypami. Niestety w wyniku prowadzenia hodowli Huh-7, zakażonej wcześniej odpowiednio skonstruowanym replikonem, powstające cząstki wirusowe charakteryzowały się dużo mniejszą infekcyjnością *in vitro* niż cząstki powstałe w wyniku zakażenia komórek materiałem genetycznym JFH1 (genotyp 2a). Ponadto replikacja zachodziła tylko po wyselekcjonowaniu mutacji adaptacyjnych w obrębie sekwencji NS3, NS4A, NS5A [38, 39]. Mimo wszystko, doświadczenie to pozwoliło na zaobserwowanie różnic pomiędzy genotypem 1a oraz 2a, co może mieć kluczowe znaczenie w terapii antywirusowej. W komórkach zakażonych replikonem zawierającego RNA genotypu 1a powstawały zdecydowanie większe ilości RNA wirusowego niż w przypadku transfekcji komórek szczepem JFH1. JFH1 produkował mniej białka rdzeniowego i jednocześnie mniej RNA wirusowego ulegało sekrecji do supernatantu [39].

6. Podsumowanie

Badania nad stworzeniem systemu replikacyjnego HCV *in vitro* trwają do chwili obecnej. Naukowcom udało się doprowadzić do replikacji i tworzenia cząstek zakaźnych genotypu 2a (JFH1) [34]. System ten pozwolił na poznanie szczegółów dotyczących cyklu replikacyjnego, funkcji poszczególnych białek wirusowych oraz skuteczności stosowanej obecnie terapii antywirusowej. Jednak doprowadzenie do replikacji genotypu 1 w liniach komórkowych okazało się być o wiele trudniejsze [3, 17, 18, 22, 38, 39]. Opublikowane w 2007 roku wyniki badań Kato i wsp. potwierdziły, iż genotypy 1a oraz 1b replikują się *in vitro* znacznie słabiej niż JFH1 [18]. Po raz kolejny dostarczyło to dowodów na istniejące różnice w replikacji pomiędzy genotypami. Stworzone do tej pory systemy

replikacji genotypu 1 wymagają dalszych badań, gdyż ograniczona zdolność replikacji nie pozwala na prowadzenie sukcesywnych oraz wiarygodnych badań nad biologią molekularną tego wirusa. Jednocześnie uniemożliwia to znalezienie nowych, skuteczniejszych związków antywirusowych, co w przypadku genotypu 1 ma szczególne znaczenie ze względu na jego rozpowszechnienie. Genotyp ten jest również uważany za sprawcę większości uszkodzeń wątroby oraz innych powikłań powodowanych przez zakażenie HCV [4, 11]. Gorsza odpowiedź genotypu 1 na terapię interferonem zmusza do konieczności stworzenia nowego leku, w czym niewątpliwie olbrzymią rolę odegrałyby badania prowadzone na liniach komórkowych. Dlatego tak duże znaczenie ma stworzenie odpowiednio funkcjonującego systemu replikacji *in vitro* dla genotypu 1.

Podziękowania

Serdeczne podziękowania dla dr Wadima Kapulkina za cenne uwagi podczas pisania tej pracy.

Piśmiennictwo

1. Ali S., Pellerin C., Lamarre D., Kukolj G.: Hepatitis C virus subgenomic replicons in the Human Embryonic Kidney 293 cell line. *J. Virol.* **78**, 491–501 (2004)
2. Beard M.R., Abell G., Honda M., Carroll A., Gartland M., Clarke B., Suzuki K., Lanford R., Sangar D.V., Lemon S.M.: An infectious molecular clone of Japanese genotype 1b hepatitis C virus. *Hepatology*, **30**, 316–324 (1999)
3. Blight K.J., McKeating J.A., Marcocigiano J., Rice C.M.: Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J. Virol.* **77**, 3181–3190 (2003)
4. Bruno S., Mondelli M.U.: i wsp. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology*, **25**, 754–758 (1997) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
5. Bukh J, Purcell R.H., Miller R.H.: Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4942–4946 (1992)
6. Cai Z., Hang C., Chang K.-S., Jiang J., Ahn B.-C., Wakita T., Liang T.J., Luo G.: Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J. Virol.* **79**, 13963–13973 (2005)
7. Chen S.L., Morgan T.R.: The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int. J. Med. Sci.* **3**, 47–52 (2006)
8. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**, 359–362 (1989)
9. Choo Q.L., Houghton M.: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2451–2455 (1991)
10. Chung R.T., He W., Saquib A., Contreras A.M., Xavier R.J., Chawala A., Wang T.C., Schmidt E.V.: Hepatitis C virus replication is directly inhibited by IFN- α in a full-length binary expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9847–9852 (2001)
11. Dusheiko G., Schmilovitz-Weiss H., Brown D., McOmish F., Yap P.-L., Sherlock S., McIntyre N., Simmonds P.: Hepatitis C

- virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*, **19**, 13–18 (1994)
12. Duverlie G., Wychowski C.: Cell culture systems for the hepatitis C virus. *World J. Gastroenterol.* **13**, 2442–2445 (2007)
 13. Flint M., von Hahn T., Zhang J., Farquhar M., Jones C.T., Balfe P., Rice C.M., McKeating J.A.: Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **80**, 11331–11342 (2006)
 14. Friebe P, Lohmann V., Krieger N., Bartenschlager R.: Sequences in the 5' nontranslated region of the hepatitis C required for RNA replication. *J. Virol.* **75**, 12047–12057 (2001)
 15. Gu B., Gates A.T., Isken O., Behrens S.-E., Sarisky R.T.: Replication studies using genotype 1a subgenomic hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **77**, 5352–5359 (2003)
 16. Guo J.-T., Bichko V.V., Seeger C.: Effect of alpha interferon on hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **75**, 8516–8523 (2001)
 17. Heller T., Liang T.J. i wsp.: An in vitro model of hepatitis C virion production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2579–2583 (2005) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
 18. Kato T., Matsumura T., Heller T., Saito S., Sapp R.K., Murthy K., Wakita T., Liang T.J.: Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J. Virol.* **81**, 4405–4411 (2007)
 19. Kolykhalov A.A., Agapov E.V., Blight K.J., Mihalik K., Feinstone S.M., Rice C.M.: Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, **277**, 570–574 (1997)
 20. Lanford R.E., Lee H., Chavez D., Guerra B., Brasky K.M.: Infectious cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1 prototype sequence. *J. Gen. Virol.* **82**, 1291–1297 (2001)
 21. Laskus T., Radkowski M., Wang L.-F., Nowicki M., Rakela J.: Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J. Virol.* **74**, 1014–1017 (2000)
 22. Lindenbach B.D., Rice C.M. i wsp.: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, **309**, 623–626 (2005) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
 23. Lohmann V., Hoffmann S., Herman U., Penin F., Bartenschlager R.: Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J. Virol.* **77**, 3007–3019 (2003)
 24. Lohmann V., Korner F., Koch J.O., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R.: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110–113 (1999)
 25. Mercer D.F., Kneteman N.M. i wsp.: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* **7**, 921–933 (2001) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
 26. Pietschmann T., Bartenschlager R.: Tissue culture and animal models for hepatitis C virus. *Clin. Liver. Dis.* **7**, 23–43 (2003)
 27. Pietschmann T., Lohmann V., Rutter G., Kurpanek K., Bartenschlager R.: Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J. Virol.* **75**, 1252–1264 (2001)
 28. Pileri P., Abrignani S. i wsp.: Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **282**, 938–941 (1998) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
 29. Podlasin R.B.: Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C u chorych leczonych powtarzanymi dializami. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 541–547 (2005)
 30. Rosińska M., Zieliński A.: Oszacowanie występowania chorób zakaźnych (wirusowe zapalenie wątroby typu C i B, HIV) wśród narkomanów przyjmujących środki odurzające w iniekcji w miastach o różnym stopniu realizacji programów redukcji szkód. Raport z programu badawczego, dostępny na stronie: <http://www.narkomania.gov.pl/epidemiologia.htm> (01 lipca 2008, data ostatniego sprawdzenia adresu)
 31. Rothwangl K.B., Manicassamy B., Uprichard S.L., Rong L.: Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding. *Virology* **5**, 46 (2008)
 32. Seyfried H., Brojer E., Grabarczyk P., Rosińska M., Gronowska A., Łętowska M.: Analiza częstości wykrywania markerów zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) u polskich dawców krwi w latach 1994–2003. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 807–814 (2005)
 33. Shimizu Y.K., Feinstone S.M., Kohara M., Purcell R.H., Yoshikura H.: Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology*, **23**, 205–209 (1996)
 34. Wakita T., Liang T.J. i wsp.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**, 791–796 (2005) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
 35. Windisch M.P., Frese M., Kaul A., Trippler M., Lohmann V., Bartenschlager R.: Dissecting the interferon-induced inhibition of hepatitis C virus replication by using a novel host cell line. *J. Virol.* **79**, 13778–13793 (2005)
 36. Witthoft T., Alshuth U. i wsp.: Safety, tolerability and efficiency of peginterferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C in clinical practice: The German Open Safety Trial. *J. Viral. Hepat.* **14**, 788–796 (2007) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
 37. Yanagi M., Purcell R.H., Emerson S.U., Bukh J.: Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8738–8743 (1997)
 38. Yi M., Lemon S.M.: Adaptive mutations producing efficient replication of genotype 1a hepatitis C virus RNA in normal Huh7 cells. *J. Virol.* **78**, 7904–7915 (2004)
 39. Yi M., Villanueva R.A., Thomas D.L., Wakita T., Lemon S.M.: Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2310–2315 (2006)
 40. Zarebska-Michaluk D., Lebensztejn D.M., Kryczka W.: Skuteczność skojarzonego leczenia rekombinowanym interferonem alfa z rybawiryną chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C i obecnością zespołów pozawątrobowych. *Przegl. Epidemiol.* **61**, 551–558 (2007)
 41. Zein N.N.: Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 223–235 (2000)
 42. Zein N.N., Rakela J., Krawitt E.L., Reddy K.R., Tominaga T., Persing D.H.: Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative study group. *Ann. Intern. Med.* **125**, 634–639 (1996)
 43. Zhang J., Randall G., Higginbottom A., Monk P., Rice C.M., McKeating J.A.: CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J. Virol.* **78**, 1448–1455 (2004)
 44. Zhong J., Gastaminza P., Cheng G., Kapadia S., Kato T., Burton D.R., Wieland S.F., Uprichard S.L., Wakita T., Chisari F.V.: Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9294–9299 (2005)

Małgorzata Pawlikowska, Wiesław Deptuła

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytet Szczeciński
ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

Wpłynęło w lipcu 2009 r.

1. Charakterystyka chlamydii i białek HSP. 2. Chlamydialne białko HSP10. 3. Chlamydialne białko HSP60. 4. Chlamydialne białko HSP70. 4. Podsumowanie

Heat shock proteins (HSPs) and chlamydiosis and chlamyphilosis

Abstract: Heat shock proteins (HSPs) are a conservative group of proteins, which are produced by prokaryotic and eukaryotic cells in response to external signals. HSPs are divided into six groups depending on their molecular weight. Three groups of HSPs: HSP10, HSP60 and HSP70 are involved in infections with *Chlamydia* and *Chlamydomphila*. Studies have shown that HSPs are connected with primary and secondary infections with *Chlamydia (C.) trachomatis* and *Chlamydomphila (Cp.) pneumoniae*. HSPs can stimulate cells of the immunological system, increasing the synthesis of proinflammatory cytokines (IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23), which in turn enhance the pathogenic potential of these bacteria, as demonstrated in experimental infections in animals. Cooperation of human and chlamydial HSP60 increases the pathogenicity of *Chl. pneumoniae*, which was shown in coronary heart disease. On the other hand, detection of anti-HSP antibodies in serum can indicate infection with *Chlamydia* or *Chlamydomphila*. In summary, heat shock proteins are responsible for pathogenic effect of *Chlamydia* and *Chlamydomphila*, but may also be used in diagnosis of these bacteria.

1. Characteristics of chlamydiae and HSPs. 2. Chlamydial HSP10. 3. Chlamydial HSP60. 4. Chlamydial HSP70. 4. Summary

Słowa kluczowe: HSP, *C. trachomatis*, *Cp. pneumoniae*

Key words: HSPs, *C. trachomatis*, *Cp. pneumoniae*

1. Chlamydie i chlamydofile oraz białka HSP

Bakterie z rodzajów *Chlamydia* sp. i *Chlamydomphila* sp., są unikalnymi organizmami prokariotycznymi, bo wyróżnia je bytowanie wewnątrzkomórkowe w wytworzonych inkluzjach w komórkach gospodarza, odmienna morfologia, a także ich cykl życiowy [53]. Ta ostatnia cecha to unikalny, występujący tylko u nich, cykl rozwojowy trwający 48–72 godziny, w którym występują dwie formy morfologiczne: ciało elementarne – EB (*elementary body*) – jako forma zakaźna i ciało siateczkowate – RB (*reticulate body*) jako forma aktywna metabolicznie – nie zakaźna [53]. Zarazki te powszechne w środowisku są odpowiedzialne za wywoływanie wielu chorób, występujących w różnej postaci, u ludzi i zwierząt (tab. I). Ich patogenność jest związana między innymi z osiadczeniem powierzchniowych antygenów w obrębie których znajduje się jeden antygen, którego obecność jest warunkowana białkami szoku termicznego (HSP – *heat shock protein*) [4, 18, 25, 46, 56]. Białka HSP tworzą dużą rodzinę filogenetycznie konserwatywną, pod względem budowy i funkcji [7, 48]. Syntezowane są zarówno przez orga-

nizmy prokariotyczne jak i eukariotyczne, w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne i wewnętrzne. Jako białka opiekuńcze (chaperonowe) oddziałują m.in. na wiele procesów fizjologicznych, w tym syntezę i transport białek w komórce [7, 48]. Obecnie HSP dzieli się na 6 klas w zależności od masy cząsteczkowej i są to: HSP100 (100–110 kDa), HSP90 (90 kDa), HSP70 (70 kDa), HSP60 (60 kDa), HSP40 (40 kDa) i sHSP (małe białka HSP 10–30 kDa) [7, 48]. Do tej pory wykazano, że 3 chlamydialne HSP (HSP10, HSP60, HSP70), spośród 6 opisanych klas HSP, mogą być wskaźnikami zakażenia i przebiegu chorób wywołanych przez te zarazki lub są czynnikami wywołującymi odpowiedź immunologiczną [1–6, 8–10, 14–20, 23–28, 30–48, 54–64].

2. Chlamydialne białko HSP10 (cHSP10)

Białko cHSP10 ma masę cząsteczkową 10 kDa, występuje w błonie zewnętrznej chlamydialnych ciałek EB i jest wysoce konserwatywne [10]. Główną funkcję pełni w chronicznych i wtórnych zakażeniach

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin, tel. (091) 444 16 05, 444 15 92; fax (091) 444 16 05; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

Charakterystyka zarazków z rodziny *Chlamydiaceae* [21, 52, 53].

Gatunek	Biowar	Serowar	Zmiany chorobowe	Immunotyp
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Trachoma	A, B, Ba, C D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K	Wykazano istnienie 1 immunotypu*	endemiczna trachoma (jaglica) (człowiek) choroby dróg moczowo-płciowych: nierzeźączkowe i porzeźączkowe zapalenie cewki moczowej, zapalenie prostaty, zapalenie najądrzy, niepłodność mężczyzn, zapalenie szyjki macicy, rak szyjki macicy, zapalenie moczowodu; zapalenie narządów miednicy mniejszej (PID), niepłodność kobiet, zapalenie odbytnicy, syndrom Fitz-Hugh-Curtisa, syndrom Reitera; zapalenie spojówek noworodków, zapalenie płuc noworodków, zespół SIDS (człowiek); bezobjawowe zakażenie u bydła**
	LGV	L1, L2, L3, L2a		lymphogranuloma venereum (ziarniniak weneryczny) (człowiek)
<i>Chlamydia suis</i>	Brak danych	Brak danych	Brak danych	zapalenie spojówek, płuc, jelit, osierdza, stawów, ronienia i słabość noworodków (świnie); zapalenie cewki moczowej i najądrzy (dziki)
<i>Chlamydia muridarum</i>	Brak danych	Brak danych	Brak danych	zapalenie płuc i jelit (myszy, chomiki); zapalenie najądrzy (szczury)
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	TWAR	TW-183, AR-37, AR-277, AR-388, AR-427, AR-231, LR-65	Brak danych	schorzenia dolnych i górnych dróg oddechowych: zapalenie oskrzeli i płuc, astma, obturacyjna choroba płuc, sarkoidoza; choroby układu krążenia: choroba wieńcowa, miażdżyca, tętniaki aorty; choroby układu nerwowego: choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane; odczynowe zapalenie stawów; chłoniaki T-komórkowe skóry (ziarniniak grzybiasty, syndrom Sezary'ego), stan przed-rzucawkowy (człowiek); zapalenie płuc, mięśnia sercowego i jelit (żółwie); zapalenie i obrzęk wątroby (krokodyle); zmiany wątrobowe, degeneracja i zapalenie nerek, zapalenie mięśnia sercowego i nekroza śledziony (żaby)
	Koala	Brak danych		schorzenia dróg oddechowych, oczu, dróg moczowo-płciowych (koala); zapalenie płuc, anemia (żaby)
	Equine	Brak danych		schorzenia górnych dróg oddechowych, zapalenie spojówek, wątroby i stawów, zwyrodnienie mózgu (konie)
<i>Chlamydophila psittaci</i>	Brak danych	A, B, C, D, E, M56	Wykazano istnienie 1 immunotypu *	zapalenie spojówki i rogówki, schorzenia dróg oddechowych, zaburzenia nerwowe, utrata piór i zmniejszona płodność, zamieranie zarodków (ptaki dzikie i domowe); zapalenie stawów, spojówek, wątroby, zwyrodnienie mózgu (konie); zapalenia oskrzeli i płuc, wsierdza, mięśnia sercowego, mózgu, opon mózgowych i rdzenia nerwowego, uszkodzenie nerek (człowiek); zapalenie rogówki i spojówki oraz płuc (psy)
		WC		zapalenie jelit (bydło)
<i>Chlamydophila abortus</i>	Brak danych	Brak danych	Wykazano istnienie 2 immunotypów*	ronienia, słabość noworodków (bydło, owce, kozy, konie, świnie); zapalenie błony śluzowej macicy i pochwy (kozy); zapalenie spojówek, płuc, mózgu, stawów, ronienia (psy); obniżona płodność, śmierć płodów, wodogłowie, zapalenie spojówek i płuc (króliki); ronienia i słabość noworodków, zapalenie płuc (człowiek)
<i>Chlamydophila felis</i>	Brak danych	Brak danych	Brak danych	nieżyt nosa, zapalenie spojówek i atypowe zapalenie płuc (koty); zapalenie mięśnia sercowego i kłębuszków nerkowych (człowiek)
<i>Chlamydophila caviae</i>	Brak danych	Brak danych	Brak danych	zapalenie spojówek (świnka morska)
<i>Chlamydophila pecorum</i>	Brak danych	Brak danych	Brak danych	zapalenie spojówek, ślepotą, schorzenia dróg oddechowych, bezpłodność (koala); zapalenie spojówek, płuc, stawów, mózgu, ronienia (owce, bydło); zapalenie narządów miednicy mniejszej, bezpłodność, poronienia, zapalenie śluzówki macicy (owce); zapalenie macicy, bezpłodność (bydło); ronienia (świnie);

* – w badaniach zjawisk odpornościowych u królików immunizowanych 3 szczepami *Chlamydia psittaci* (obecnie *Cp. psittaci* i *Cp. abortus*) oraz jednym szczepem *C. trachomatis*, zarejestrowano odmienny obraz odpornościowy, na podstawie którego wyodrębniono 1 immunotyp w obrębie *C. trachomatis* i *Cp. psittaci* oraz 2 immunotypy w obrębie *Cp. abortus*. [48–50]

** – wykazano w nasieniu buhajów obecność *C. trachomatis* [22]

ludzi wywołanych przez *Chlamydia (C.) trachomatis* [10]. cHSP10 jest także homologiem czynnika wczesnej ciąży (EPF – *early pregnancy factor*), który występuje u kobiet ciężarnych, choć także stwierdza się go w surowicy krwi obok przeciwciał anti-HSP10, u kobiet po przebytej infekcji *C. trachomatis* [9]. Wykazano, że stymulacja cHSP10 limfocytów o nieokreślonym fenotypie, pobranych z błony śluzowej szyjki macicy od kobiet zainfekowanych *C. trachomatis*, zwiększa ich proliferację [1]. Także u kobiet w pierwotnej infekcji na tle *C. trachomatis* obserwuje się, w wyniku stymulacji cHSP10 tego zarazka, podwyższoną syntezę surowiczych IgG i IgA [1]. Dalszym dowodem oddziaływania tych białek u kobiet z bezpłodnością na tle *C. trachomatis*, jest podwyższony poziom surowiczych przeciwciał IgA [34]. Podobnie podwyższoną reakcją serologiczną na cHSP10 *C. trachomatis*, zaobserwowano u kobiet z bezpłodnością jajowodową (TFI – *tubal factor infertility*) [41]. Udział HSP10 wykazano także *in vitro* w hodowli komórek HEp-2 zakażonych *Chlamydophila (Cp.) pneumoniae* – szczep A03, gdzie stwierdzono wyższy poziom ekspresji cHSP10 po dodaniu do hodowli IFN γ i zadziałaniu na nie temperaturą 42°C [47]. W analogicznych warunkach wykazano, że rekombinowane białko cHSP10 *Cp. pneumoniae*, może stymulować, choć słabiej niż rekombinowane cHSP60, dojrzewanie monocytarnych komórek dendrytycznych (MDDC – *monocyte-derived dendritic cells*) [2].

3. Chlamydialne białko HSP60 (cHSP60)

cHSP60 (masa cząsteczkowa 60 kDa) występuje analogicznie jak i HSP10 w błonie zewnętrznej ciałek elementarnych (EB) chlamydii i jest określane jako białko GroEL1 [4, 46]. Należy ono do grupy chaperonów, których zadaniem jest ochrona białek tych bakterii w stanach fizjologicznych przed denaturacją i rozpadem oraz ochronę w trakcie stresu termicznego [13, 64]. Wykazano *in vitro*, że cHSP60 *Cp. pneumoniae* – szczep J-138, inicjuje wzrost szczurzych komórek mięśni gładkich naczyń, co może być dowodem, że ten mechanizm zachodzi przy powstawaniu blaszek miażdżycowych w naczyniach u ludzi podczas infekcji tą bakterią [27]. Natomiast w przypadku zakażenia komórek Hep-2 *Cp. pneumoniae* – izolat GiD, stwierdzono że białko GroEL1 (cHSP60), warunkuje patogenność tej bakterii, gdyż poprzez stymulację translokacji czynnika NF- κ B dochodzi do aktywacji komórek nabłonkowych [63].

Rolę białka HSP60, potwierdzają obserwacje *in vitro* w hodowli komórek HEp-2 po zadziałaniu na nią IFN γ i przy ograniczeniu żelaza, jak i w odpowiedzi na temperaturę 42°C, w której stwierdzono wzrost eks-

presji cHSP60 *Cp. pneumoniae* – szczep A03 [47]. Podobnie *in vivo* u myszy, wykazano, że cHSP60 *Cp. pneumoniae*, indukuje poprzez stymulację TLR-2 i TLR-4, dojrzewanie komórek dendrytycznych ze szpiku (BMDDC – *bone marrow-derived dendritic cells*) [16]. W innym doświadczeniu, też *in vivo*, wykazano u myszy, że cHSP60 *Cp. pneumoniae* hamuje ekspresję TNF, powodując równocześnie akumulację komórek PMN w jamie otrzewnej, co prowadzi poprzez receptory TLR-2 i TLR-4 do indukcji procesów zapalnych [17]. Wykazano także, że białko HSP60 *C. trachomatis* w hodowli trofoblastów stymuluje także apoptozę, poprzez włączenie kaspazy-3, -8 i -9 [25]. Potwierdzono to u kobiet z zapaleniem narządów miednicy mniejszej (PID – *pelvic inflammatory disease*), wywołanym na tle *C. trachomatis*, u których stwierdzono podwyższony poziom przeciwciał dla chlamydialnego HSP60 [26, 44, 55, 61, 62]. Sugeruje się, że stwierdzany wysoki poziom przeciwciał anti-cHSP60 u kobiet zwiększa dwu- lub nawet trzykrotnie, potencjalną możliwość zachorowania na PID w wyniku infekcji *C. trachomatis* [55]. Dowiedziano także, że w trakcie PID u kobiet zakażonych *C. trachomatis* odpowiedź ich organizmu na cHSP60, objawia się obniżoną sekrecją IFN γ przez limfocyty krwi obwodowej [20]. Także *in vitro*, gdzie wykorzystano rekombinowane białko cHSP60, wykazano pobudzenie proliferacji limfocytów o nieokreślonym fenotypie pochodzące z krwi obwodowej od kobiet cierpiących na bezpłodność związaną z zakażeniem *C. trachomatis* [60].

Dowiedziano także, że kobiety z bezpłodnością i zakażone *C. trachomatis*, wykazują podwyższony poziom surowiczych przeciwciał IgA przeciw cHSP60 *C. trachomatis* [36] oraz zwiększoną syntezę IFN- γ , IL-10 i TNF α przez komórki mononuklearne, pochodzące z błony śluzowej dróg rodnych [58]. Opisano także podwyższony poziom przeciwciał IgG u kobiet z pierwotną infekcją *C. trachomatis*, gdy u kobiet z nawracającym zakażeniem na tle tego zarazka, zarejestrowano dodatkowo podwyższony poziom przeciwciał anti-HSP60 oraz IFN γ [1]. Także u kobiet z podejrzeniem bezpłodności wywołanym przez *C. trachomatis*, stwierdza się z reguły wzrost przeciwciał anti-cHSP60 oraz surowiczych przeciwciał dla tej bakterii [15]. Hipotezę wzrostu przeciwciał dla chlamydialnego HSP60 potwierdzono u kobiet z dysfunkcją jajowodów na tle infekcji *C. trachomatis* [6]. Nadto u kobiet z wtórnym zakażeniem *C. trachomatis*, również zarejestrowano wysoki poziom przeciwciał anti-cHSP60, który korelował dodatkowo z objawami chorobowymi [24]. Natomiast u kobiet z chlamydialną bezpłodnością jajowodową, przyjmuje się, że cHSP60 indukując sekrecję IFN γ oraz IL-10, staje się elementem patogenyzy wspomnianego stanu chorobowego [37]. Również u kobiet, które miały problemy

z zacięciem w ciążę z powodu chlamydialnej infekcji jajowodów, zarejestrowano nie tylko podwyższony poziom przeciwciał anti-cHSP60, ale także przeciwciał klasy IgA i IgG [30]. Podobnie wysoki poziom przeciwciał anti-HSP60 *C. trachomatis*, stwierdzono u kobiet leczących się z powodu bezpłodności, przy czym stosunkowo wysoki odsetek wyników dodatnich był rejestrowany u kobiet po zabiegach zapłodnienia *in vitro* [35]. Natomiast u kobiet ciężarnych i zakażonych *C. trachomatis* wykazano, że krzyżowa reakcja chlamydialnego i ludzkiego HSP60, które pojawia się we wczesnej fazie embriogenezy, jest przyczyną destrukcji embrionu i zaburzeń rozwoju płodu [26, 35]. Również u kobiet zakażonych *C. trachomatis* – serowar E, stwierdzono *in vitro* w komórkach nabłonkowych błony śluzowej macicy, że w przypadku obniżenia poziomu żelaza następuje wzrost ekspresji białka cHSP60 [40]. Sugeruje to, że cHSP60 *C. trachomatis*, może być jednym z czynników onkogenezy nowotworów jajników, gdyż akumulacja egzogenego cHSP60 w cytoplazmie komórek zakażonych, prowadzi do zahamowania apoptozy, co może prowadzić do powstania komórek nowotworowych [23].

Również u mężczyzn z nierzęzączkowym zapaleniem cewki moczowej (NGU – *Non-Gonococcal Urethritis*) na tle *C. trachomatis*, stwierdzono obecność w surowicy krwi białek HSP60, co może dowodzić ich udziału w powstawaniu tego schorzenia [32]. Także podwyższony poziom przeciwciał anti-cHSP60 w jaglicy u osób chorych, może być dowodem ich udziału w tym schorzeniu [54]. Morrison i wsp. [45] stwierdzili u świnek morskich zakażonych *Cp. psitaci* – szczep GPIC, nagromadzenie się limfocytów i monocytów w błonie śluzowej oka, powstałej wskutek indukcji odpowiedzi komórkowej typu późnego (DTH – *delayed-type hypersensitivity*) przez cHSP60. Odpowiedź w postaci dodatniego odczynu DTH uzyskano także u małp z zapaleniem jajowodu na tle *C. trachomatis*, którym podano rekombinowane cHSP60 [12] oraz u makaków zakażonych eksperymentalnie *C. trachomatis* – serowar E, w odpowiedzi na chlamydialne białko HSP60 [42]. Także reakcję DTH oraz podwyższony poziom IgG2a w surowicy zarejestrowano u myszy, którym podano szczepionkę DNA zawierającą gen kodujący białko HSP60 (groEL) *Cp. abortus* – szczep AB7 [31]. Dowiedziono, że rekombinowane chlamydialne HSP60 *C. trachomatis* oraz ludzkie HSP60, aktywuje *in vitro* ludzkie komórki śródbłonna naczyń, mięśni gładkich oraz monocytów-makrofagów, do wydzielania selektyny E, ICAM-1, V-CAM-1 oraz IL-6 [38], zaś oddziałując nim w analogicznych warunkach na ludzkie monocyty, stwierdzono intensywną syntezę IL-1 β , IL-6 i IL-8, selektyny E, ICAM-1 oraz VCAM-1 [43]. Wyniki tych badań [38, 43] sugerują, że współdziałanie chlamydialnego i ludzkiego HSP60

[38] prowadząc do indukcji selektyn i cytokin, w tym cytokin zapalnych [43], powoduje zaostrzenie się stanu zapalnego w infekcji na tle tych zarazków, co jest m.in. groźne w przypadku miażdżycy naczyń krwionośnych u ludzi w przypadku zakażenia *Cp. pneumoniae*. Podobne pobudzenie syntezy IL-1 β , IL-6, IL-8 oraz TNF α przez komórki linii THP-1 (THP-1 – ludzkie komórki promielomonocytarne) zanotowano po stymulacji rekombinowanym cHSP60 *C. trachomatis* [5]. Ponadto wykazano, że w trakcie zakażenia ludzi *Cp. pneumoniae*, dochodzi do reakcji krzyżowej pomiędzy chlamydialnym, a ludzkim HSP60, znajdującym się w złogach płytek miażdżycowych, co prawdopodobnie doprowadza do aktywacji limfocytów T wobec własnych komórek śródbłonna naczyń i co w efekcie powoduje uszkodzenie, a więc sytuację ułatwiającą odkładanie się złogów lipidowych [8]. Potwierdzono to *in vitro* z ludzkimi makrofagami pobranymi od osób z miażdżycą, gdzie białko cHSP60 *Cp. pneumoniae*, reagując z ludzkim białkiem HSP60, indukowało syntezę i wydzielanie TNF α i MMP-9 (MMP-9 – *matrix metalloproteinase-9* – metaloproteinaza macierzy-9) przez te komórki [39]. Obserwacja ta wyjaśniła fakt, że u pacjentów z dusznicą bolesną, chorobą wieńcową i zawałem mięśnia sercowego [14] oraz u pacjentów z ostrym syndromem wieńcowym [11], stwierdza się podwyższony poziom surowicznych przeciwciał anti-cHSP60 *Cp. pneumoniae*. Wykazano u osób z chorobą wieńcową, że podwyższony poziom przeciwciał anti-cHSP60 *Cp. pneumoniae*, nie idzie zawsze w parze z podwyższonym poziomem przeciwciał anti-*Cp. pneumoniae* klasy IgG i IgA [28]. Dalszym dowodem roli cHSP60 *Cp. pneumoniae* w patogenezie schorzeń serca, jest to, że u osób zmarłych na ostry zawał mięśnia sercowego zarejestrowano obecność tego białka *Cp. pneumoniae* w całym „drzewie wieńcowym” [56]. Udział tych białek potwierdzono również u osób z chorobą niedokrwienną serca oraz u osób cierpiących na astmę, u których stwierdzono podwyższony poziom przeciwciał anti-cHSP60 *Cp. pneumoniae* [29, 33, 34]. Należy także dodać, że badania Steptoe i wsp. [59] z 2007 roku, wprawdzie nie wykazały korelacji pomiędzy chorobami sercowo-naczyniowymi, a obecnością przeciwciał anti-*Cp. pneumoniae* i ludzkim HSP60, to autorzy sugerują, że fakt ten może również wskazywać na ochronną rolę ludzkich białek HSP60 w tych infekcjach [59]. Wykazano, że rekombinowane białko cHSP60 *Cp. pneumoniae*, wzmaga i indukuje *in vitro* dojrzewanie ludzkich monocytarnych komórek dendrytycznych (MDDC) oraz powoduje polaryzację limfocytów T poprzez ekspresję mRNA podjednostek formujących IL-12 i IL-23 [2]. W innym doświadczeniu [3] wykazano, że rekombinowane białko cHSP60 *Cp. pneumoniae*, indukuje *in vitro* proliferację zarówno ludzkich jak i mysich

limfocytów krwi obwodowej, a dodatkowo wzmacnia sekrecję IFN γ w ludzkich limfocytach oraz zwiększa reakcję limfocytów typu DTH u myszy. Również u osób z regionu gdzie występuje endemicznie jaglica, z wykorzystaniem rekombinowanego, gatunkowo swoistego dla *Chlamydiaceae* białka HSP60, stwierdzono podwyższony poziom przeciwciał klasy IgG dla *C. trachomatis*, *Cp. pneumoniae* oraz *Cp. psittaci* [19]. W badaniu tym wykazano udziału w patogenezie jaglicy, oprócz *C. trachomatis*, dodatkowo *Cp. pneumoniae* oraz *Cp. psittaci* [19].

3. Chlamydialne białko HSP70 (cHSP70)

cHSP70 jest to białko o masie cząst. 75 kDa i podobnie jak HSP10 i HSP60, występujące w błonie zewnętrznej ciałek EB i wykazuje wysoką immunogenność [18]. Rola tego białka u *C. trachomatis*, to głównie utrzymanie integralności błony zewnętrznej ciałek EB, co pozwala na utrzymanie specyficznej równowagi pomiędzy tą bakterią, a komórką gospodarza, a nadto bierze ono udział w przemianach EB w formę aktywną metabolicznie, czyli w ciało RB [56]. Zarejestrowano także wysoką ekspresję cHSP70 w hodowli komórek HEp-2 zakażonych *Cp. pneumoniae* – szczep A03, po traktowaniu hodowli IFN γ oraz przy ograniczeniu jonów żelaza i w odpowiedzi temperaturę 42°C [47].

4. Podsumowanie

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że chlamydialne białka szoku termicznego (cHSP10, cHSP60, cHSP70) biorą udział w patogenezie chlamydioz i chlamydofiloz m.in. poprzez indukowanie sekrecji cytokin prozapalnych (IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23). Dzieje się tak w drogach rodnych kobiet zakażonych *C. trachomatis*, gdzie dochodzi do uszkodzeń jajowodów, w wyniku stymulacji cząstek adhezyjnych komórek śródbłonna naczyń i mięśni gładkich, co ułatwia agregację *C. trachomatis*. Podobny mechanizm przebiega w przypadku miażdżycy naczyń wywołanej *Cp. pneumoniae*, która poprzez interakcję z ludzkim białkiem HSP60 na makrofagach, stymuluje te komórki do wydzielania cytokin, które prowadzą do uszkodzenia ścian naczyń wieńcowych. Z drugiej strony trzeba stwierdzić, że rejestrowana obecność przeciwciał anty-cHSP60, może być wykorzystywana w diagnostyce schorzeń chlamydialnych takich jak schorzenia sercowo-naczyniowe czy jaglica. Szczególnie przydatne wydaje się być oznaczanie tych przeciwciał w chorobach układu krążenia ze względu na udział *Cp. pneumoniae* w etiologii m.in. zawału mięśnia sercowego, duszniczy bolesnej czy cho-

roby wieńcowej. Z przytoczonymi danymi wynika, że niezależnie od ochronnej roli białek szoku termicznego w komórce, biorą one także aktywny udział w patogenezie chlamydioz i chlamydofiloz, co praktycznie można wykorzystać to zarówno w diagnostyce jak i w monitorowaniu chorób wywołanych przez nie.

Piśmiennictwo

1. Agrawal T., Vatas V., Salhan S., Mittal A.: Mucosal and peripheral immune responses to chlamydial heat shock proteins in women infected with *Chlamydia trachomatis*. *Clin. Exp. Immunol.* **148**, 461–468 (2007)
2. Ausiello C.M., Fedele G., Palazzo R., Spensieri F., Ciervo A., Cassone A.: 60-kDa heat shock protein of *Chlamydia pneumoniae* promotes a T helper type 1 immune response through IL-12/IL-23 production in monocyte-derived dendritic cells. *Microbes Infect.* **8**, 714–720 (2006)
3. Ausiello C.M., Palazzo R., Spensieri F., Fedce G., Lande R., Ciervo A., Fioroni G., Cassone A.: 60-kDa heat shock protein of *Chlamydia pneumoniae* is a target of T-cell immune response. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **19**, 136–140 (2005)
4. Bavoil P., Stephens R.S., Falkow S.A.: A soluble 60 kilodalton antigen of *Chlamydia* spp. Is a homologue of *Escherichia coli* GroEL. *Mol. Microbiol.* **4**, 461–469 (1990)
5. Bas S., Neff L., Vuillet M., Spenato U., Seya T., Matsumoto M., Gabay C.: The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J. Immunol.* **180**, 1158–1168 (2008)
6. Bax C.J., Dörr P.J.: *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 (cHSP60) antibodies in women without and with tubal pathology using a new commercially available assay. *Sex. Transm. Infect.* **80**, 415–416 (2004)
7. Becker J., Craig E.A.: Heat shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* **219**, 11–23 (1994)
8. Benagiano M., D'elios M.M., Amedei A., Azzurri A., Van Der Zee R., Ciervo A., Rombola G., Pomagnani S., Cassone A., Del Prete G.: Human 60-kDa heat shock protein is a target autoantigen of T cells derived from atherosclerotic plaques. *J. Immunol.* **174**, 6509–6517 (2005)
9. Betsou F., Borrego M.J., Guillaume N., Catry M.A., Romao S., Machado-Caetano J.A., Sueur J.M., Mention J., Faille N., Orfila J.: Cross-reactivity between *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 10 and early pregnancy factor. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 446–450 (2003)
10. Betsou F., Suer J.M., Orfila J.: Serological investigation of *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 10. *Infect. Immun.* **67**, 5243–5246 (1999)
11. Biasucci L.M., Liuzzo G., Ciervo A., Petrucca A., Piro M., Angiolillo D.J., Crea F., Cassone A., Maseri A.: Antibody response to chlamydial heat shock protein 60 is strongly associated with acute coronary syndrome. *Circulation*, **107**, 3015–3017 (2003)
12. Brunham R.C., Peeling R.W.: *Chlamydia trachomatis* antigens: role in immunity and pathogenesis. *Infect. Agents Dis.* **3**, 218–233 (1994)
13. Bukau B., Horwich A.L.: The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351–366 (1998)

14. Ciervo A., Visca P., Petrucca A., Biasucci L.M., Maseri A., Cassone A.: Antibodies to 60-kilodalton heat shock protein and outer membrane protein 2 of *Chlamydia pneumoniae* in patients with coronary heart disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 66–74 (2002)
15. Claman P., Honey L., Peeling R.W., Jessamine P., Toye B.: The presence of serum antibody to the chlamydial heat shock protein (CHSP60) as a diagnostic test for tubal factor infertility. *Fertil. Steril.* **67**, 501–504 (1997)
16. Costa C.P., Kirsching C.J., Busch D., Dürr S., Jennen L., Heinzmann U., Prebeck S., Wagner H., Miethke T.: Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by *Chlamydia pneumoniae*. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2460–2470 (2002)
17. Da Costa C.U., Wantia N., Kirsching C.J., Busch D.H., Rodriguez N., Wagner H., Miethke T.: Heat shock protein 60 from *Chlamydia pneumoniae* elicits an unusual set of inflammatory responses via Toll-like receptor 2 and 4 in vivo. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2874–2884 (2004)
18. Danilition S.L., Maclean I.W., Peeling R., Winston S., Brunham R.C.: The 75-kilodalton protein of *Chlamydia trachomatis*: a member of the heat shock protein 70 family? *Infect. Immun.* **58**, 189–196 (1990)
19. Dean D., Kandel R.P., Adhikari H.K., Hessel T.: Multiple *Chlamydiaceae* species in Trachoma: Implications for disease pathogenesis and control. *PLoS Medicine*, **5**, 57–68 (2008)
20. DeBattista J., Timms P., Allan J.: Reduced levels of gamma-interferon secretion in response to chlamydial 60 kDa heat shock protein amongst women with pelvic inflammatory disease and a history of repeated *Chlamydia trachomatis* infections. *Immunol. Lett.* **81**, 205–210 (2002)
21. Deptuła W., Pawlikowska M., Travníček M.: Chlamydofilozy u zwierząt i ludzi. *Medycyna Wet.* **58**, 337–340 (2002)
22. Deptuła W., Ruczkowska J., Szenfeld J., Choroszy-Król I., Travníček M.: Immunologický status u hovadzieho dobytku prirodzene infikovaného mikroorganizmami *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia psittaci*. *Veterinarni Med. (Praha)*, **35**, 73–80 (1990)
23. Di Felice V., David S., Cappello F., Farina F., Zummo G.: Is chlamydial heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis? *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 4–9 (2005)
24. Dutta R., Jha R., Salhan S., Mittal A.: *Chlamydia trachomatis*-specific heat shock proteins 60 antibodies can serve as prognostic marker in secondary infertile women. *Infection*, **36**, 374–378 (2008)
25. Equils O., Lu D., Gatter M., Witkin S.S., Bertolotto C., Arditi M., McGregor J.A., Simmons C.F., Hobel C.J.: Chlamydia heat shock protein 60 induces trophoblast apoptosis through TLR4. *J. Immunol.* **177**, 1257–1263 (2006)
26. Frej-Mądrzak M., Choroszy-Król I., Teryks-Wołyńiec D.: Cytokiny zapalne i pozapalne w przewlekłych i nawracających zakażeniach wywołanych przez *Chlamydia trachomatis*. *Adv. Clin. Exp. Med.* **14**, 1237–1242 (2005)
27. Fukuoka K., Sawabe A., Sugimoto T., Koga M., Okuda H., Kitayama T., Shirai M., Komai K., Komemushi S., Matsuda K.: Inhibitory actions of several natural products on proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by HSP60 from *Chlamydia pneumoniae* J138. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6326–6329 (2004)
28. Guech-Ongey M., Brenner H., Twardella D., Rothenbacher D.: *Chlamydia pneumoniae*, heat shock proteins 60 and risk of secondary cardiovascular events in patients with coronary heart disease under special consideration of diabetes: a prospective study. *BMC Cardiovasc. Disor.* **6**, 17–26 (2006)
29. Hahn D.L., Peeling R.W.: Airflow limitation, and *Chlamydia pneumoniae*-specific shock protein 60. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **101**, 614–618 (2008)
30. Hartog Den J.E., Land J.A., Stassen F.R.M., Kessels A.G.H., Bruggeman C.A.: Serological markers of persistent *C. trachomatis* infection in women with tubal factor subfertility. *Hum. Reprod.* **20**, 986–990 (2005)
31. Hechard C., Grepinet O., Rodolakis A.: Molecular cloning of the *Chlamydophila abortus* groEL gene and evaluation of its protective efficacy in a murine model by genetic vaccination. *J. Med. Microbiol.* **53**, 861–868 (2004)
32. Horner P.J., Cain D., McClure M., Thomas B.J., Gilroy C., Ali M., Weber J.N., Taylor-Robinson D.: Association of antibodies to *Chlamydia trachomatis* heat-shock protein 60 kDa with chronic nongonococcal urethritis. *Clin. Inf. Dis.* **24**, 653–660 (1997)
33. Hoymans V.Y., Bosmans J.M., Van Herck P.L., Ieven M.M., Vrints C.J.: Implications of antibodies to heat-shock proteins in ischemic heart disease. *Int. J. Cardiol.* **123**, 277–282 (2008)
34. Jafarzadeh A., Esmaeeli-Nadimi A., Shariati M.: High sensitivity C-reactive protein and immunoglobulin G against *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein-60 in ischemic heart disease. *Iran. J. Immunol.* **5**, 51–56 (2008)
35. Jakus S., Neuer A., Dieterle S., Bongiovanni A.M., Witkin S.S.: Antibody to the *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein in follicular fluid and in vitro fertilization outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.* **59**, 85–89 (2008)
36. Karinen L., Pouta A., Hartikainen A.L., Bloigu A., Paldanius M., Leinonen M., Saikku P., Järvelin M.R.: Antibodies to *Chlamydia trachomatis* heat shock proteins Hsp60 and Hsp10 and subfertility in general population at age 31. *Am. J. Reprod. Immunol.* **52**, 291–297 (2004)
37. Kinnunen A., Surcel H.-M., Halttunen M., Titinen A., Morrison R.P., Morrison S.G., Koskela P., Lehtinen M., Paavonen J.: *Chlamydia trachomatis* heat shock protein-60 induced interferon-g and interleukin-10 production in infertile women. *Clin. Exp. Immunol.* **131**, 299–303 (2003)
38. Kol A., Bourcier T., Lichtman A.H., Libby P.: Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J. Clin. Invest.* **103**, 571–577 (1999)
39. Kol A., Sukhova G.K., Lichtman A.H., Libby P.: Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophages tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*, **98**, 300–307 (1998)
40. Larue R.W., Dill B.D., Giles D.K., Whittimore J.D., Raulston J.E.: Chlamydial HSP60-2 is iron responsive in *Chlamydia trachomatis* serovar E – infected human endometrial epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* **75**, 2374–2380 (2007)
41. LaVerda D., Albanese L.N., Ruther P.E., Morrison S.G., Morrison R.P., Ault K.A., Byrne G.I.: Seroreactivity to *Chlamydia trachomatis* Hsp10 correlates with severity of human genital tract disease. *Infect. Immun.* **68**, 303–309 (2000)
42. Lichtenwalner A.B., Patton D.L., Van Voorhis W.C., Cosgrove Sweeney Y.T., Kuo C.-C.: Heat shock protein 60 is the major antigen which stimulates delayed-type hypersensitivity reaction in the macaque model of *Chlamydia trachomatis* salpingitis. *Infect. Immun.* **72**, 1159–1161 (2004)
43. Maguire M., Poole S., Coates A.R.M., Tormay P., Wheeler-Jones C., Henderson B.: Comparative cell signaling activity of ultrapure recombinant chaperonin 60 proteins from prokaryotes and eukaryotes. *Immunology*, **115**, 231–238 (2005)
44. Mascellino M.T., Ciardi M.R., Oliva A., Cecinato F., Hassemer M.P., Borgese L.: *Chlamydia trachomatis* detection in

- a population of asymptomatic and symptomatic women: correlation with the presence of serological markers for this infection. *New Microbiol.* **31**, 249–256 (2008)
45. Morrison R.P., Belland R.J., Lyng K., Caldwell H.D.: Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD chlamydial hyper-sensitivity antigen is a stress response protein. *J. Exp. Med.* **170**, 1271–1283 (1989)
46. Morrison R.P., Su H., Lyng K., Yuan Y.: The *Chlamydia trachomatis* hypoperon is homologous to the groE stress response operon of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **58**, 2701–2701 (1990)
47. Mukhopadhyay S., Miller R.D., Sullivan E.D., Theodoropoulos C., Mathews S.A., Timms P., Summersgill J.T.: Protein expression profiles of *Chlamydia pneumoniae* in models of persistence versus those of heat shock stress response. *Infect. Immun.* **74**, 3853–3863 (2006)
48. Niedźwiedzka P., Deptuła W.: Białka szoku termicznego a układ odpornościowy. *Centaur Lubuski*, **56**, 21–22 (2003)
49. Pawlikowska M., Deptuła W.: Adherence and ingesting capacity of peripheral blood granulocytes in rabbits immunized with various antigens of *Chlamydia* sp. *Centr. Europ. J. Immunol.* **24**, 293–298 (1999)
50. Pawlikowska M., Deptuła W.: Natural and adaptive immunity in rabbits immunized with *Chlamydia* sp. *Pol. J. Environ. Stud.* **14**, 669–674 (2005)
51. Pawlikowska M., Deptuła W.: Dynamika limfocytów T I B oraz ich subpopulacji u królików immunizowanych *Chlamydia* sp. *Medycyna Wet.* **62**, 701–705 (2006)
52. Pawlikowska M., Deptuła W.: Chlamydie i chlamydofile oraz choroby wywołane przez nie u ludzi. *Post. Hig. Med. Dośw.* **61**, 708–711 (2007)
53. Pawlikowska M., Deptuła W.: Chlamydie i chlamydofile. Monografia. Uniwersytet Szczeciński, Szczecin 2009.
54. Peeling R., Kimani J., Plummer F., MacClean I., Cheang M., Bwayo J., Brunham R.C.: Antibody to chlamydial hsp60 predicts an increased risk for chlamydial pelvic inflammatory disease. *J. Inf. Dis.* **175**, 1153–1158 (1997)
55. Peeling R.W., Bailey R.L., Conway D.J., Holland M.J., Campbell A.E., Jallow O., Whittle H.C., Mabey D.C.: Antibody response to the 60-kDa chlamydial shock protein is associated with scarring trachoma. *J. Infect. Dis.* **177**, 256–259 (1998)
56. Raulston J.E., Davis C.H., Paul T.R., Hobbs J.D., Wyrick P.B.: Surface accessibility of the 70-kilodalton *Chlamydia trachomatis* heat shock protein reduction of outer membrane protein disulfide bonds. *Infect. Immun.* **70**, 535–543 (2002)
57. Spagnoli L.G., Pucci S., Bonanno E., Cassone A., Sesti F., Ciervo A., Mauriello A.: Persistent *Chlamydia pneumoniae* infection of cardiomyocytes is correlated with fatal myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* **170**, 33–42 (2007)
58. Srivastava P., Jha R., Bas S., Salhan S., Mittal A.: In infertile women, cells from *Chlamydia trachomatis* infected site release higher levels of interferon-gamma, interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha upon heat shock protein stimulation than fertile women. *Repr. Biol. Endocrinol.* **6**, 20–29 (2008)
59. Steptoe A., Shamaei-Tousi A., Gylfe A., Bailey L., Bergström S., Coates A.R., Henderson B.: Protective effect of human heat shock protein 60 suggested by its association with decreased seropositivity to pathogens. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 204–207 (2007)
60. Titinen A., Surcel H.-M., Halttunen M., Birkelund S., Bloigu A., Christiansen G., Koskela P., Morrison S.G., Morrison R.P., Paaavonen J.: *Chlamydia trachomatis* and chlamydial heat shock protein 60-specific antibody and cell mediated responses predict tubal factor infertility. *Hum. Reprod.* **21**, 1533–1538 (2006)
61. Toye B., Laffarriere C., Claman P., Jessamine P., Peeling R.: Association between antibody to the chlamydial heat-shock protein and tubal infertility. *J. Infect. Dis.* **168**, 1236–1240 (1993)
62. Wagar E.A., Schachter J., Bavoil P., Stephens R.S.: Differential human serologic response to two 60,000 molecular weight *Chlamydia trachomatis* antigens. *J. Infect. Dis.* **162**, 922–927 (1990)
63. Wuppermann F.N., Mölleken K., Julien M., Jantos C.A., Hegeman J.H.: *Chlamydia pneumoniae* GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells. *J. Bacteriol.* **190**, 3757–3767 (2008)
64. Zügel U., Kaufmann S.H.E.: Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 19–39 (1999)

MIKOTOKSYNOTWÓRCZE GRZYBY FITOPATOGENICZNE Z RODZAJU *FUSARIUM* I ICH WYKRYWANIE TECHNIKAMI PCR

Michalina Suchorzyńska*, Anna Misiewicz

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
Zakład Mikrobiologii, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Wpłynęło w sierpniu 2009 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka rodzaju *Fusarium*. 2.1. Morfologia. 2.2. Charakterystyka ważnych gatunków *Fusarium*. 2.2.1. *Fusarium culmorum*. 2.2.2. *Fusarium graminearum*. 2.2.3. *Fusarium poae*. 2.3. Choroby powodowane przez *Fusarium* sp. 3. Mikotoksyny. 4. Mikotoksyny fuzaryjne. 4.1. Bowerycyna, moniliformina, fumonizyny. 4.2. Zearalenon. 4.3. Trichoteceny. 4.3.1. Trichoteceny z grupy B. 4.3.2. Trichoteceny z grupy A. 5. Występowanie mikotoksyn fuzaryjnych w Polsce i na świecie. 6. Najważniejsze czynniki środowiska związane z tworzeniem mikotoksyn. 7. Geny warunkujące formowanie zearalenonu i trichotecenów. 7.1. Charakterystyka *Tri5*, *Tri7*, *Tri3* i *Tri13*. 7.2. Charakterystyka PKS4 i PKS13. 8. Metody molekularne. 8.1. Metody detekcji i identyfikacji oparte na procedurze PCR. 8.1.1. SCAR. 8.1.2. RT-PCR. 8.1.3. Real-Time PCR. 9. Podsumowanie

Mycotoxigenic phytopathogenic fungi of *Fusarium* genus and their identification by PCR techniques

Abstract: Fungi belonging to the genus *Fusarium* are recognized as one of the most dangerous pathogens causing serious plant, human and animal diseases. In addition, they are able to produce very toxic compounds known as mycotoxins. Mycotoxins have various toxic effects on microorganisms, plants, animals and humans. The most common mycotoxins found in the natural environment are zearalenone and trichothecenes, including deoxynivalenol. These compounds cause disorders and deformations during plant growth. They also cause human and animal diseases connected with digestive, reproductive and immune system. Lots of genes are recognized in the biosynthesis of these mycotoxins. Essential genes in trichothecenes synthesis are *Tri5* and *Tri7* genes, and in zearalenone synthesis another two genes PKS4 and PKS14.

Molecular methods based on PCR allow to evaluation of mycotoxicity of filamentous fungi. The easiest and most frequently used method is SCAR. Other molecular analyses like RT-PCR and Real-Time PCR are very expensive methods but are also very sensitive and less and less labour-intensive and thus are used in this kind of tests as well.

1. Introduction. 2. Characterization of *Fusarium* genus. 2.1. Morphology. 2.2. Characterization of important *Fusarium* species. 2.2.1. *Fusarium culmorum*. 2.2.2. *Fusarium graminearum*. 2.2.3. *Fusarium poae*. 2.3. Diseases caused by *Fusarium* sp. 3. Mycotoxins. 4. *Fusarium* mycotoxins. 4.1. Beauvericins, moniliformin, fumonisins. 4.2. Zearalenone. 4.3. Trichothecenes. 4.3.1. Type B trichothecenes. 4.3.2. Type A trichothecenes. 5. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins worldwide and in Poland. 6. The most important factors involved in mycotoxins synthesis. 7. Genes involved in the biosynthesis of zearalenone and trichothecenes. 7.1. Characterization of *Tri5*, *Tri7*, *Tri3* i *Tri13*. 7.2. Characterization of PKS4 and PKS13. 8. Molecular methods. 8.1. Detection and identification methods based on PCR. 8.1.1. SCAR. 8.1.2. RT-PCR. 8.1.3. Real-Time PCR. 9. Summary

Słowa kluczowe: *Fusarium* sp., mikotoksyny, PCR, trichoteceny, zearalenon

Key words: *Fusarium* sp., mycotoxins, PCR, trichothecenes, zearalenone

1. Wprowadzenie

Grzyby z rodzaju *Fusarium* należą do najczęściej izolowanych patogenów upraw rolniczych na świecie [28]. Są one przyczyną olbrzymich strat gospodarczych, które wynikają z wysokiej patogenności i toksynotwórczości, dlatego też uznano je za jedne z najgroźniejszych grzybów strzępkowych. *Fusaria* infekują uprawy roślinne o podstawowym znaczeniu gospodarczym dla człowieka [15]. Posiadają także zdolność do syntezy wysoce niebezpiecznych i toksycznych metabolitów, zwanych mikotoksynami [47].

Mikotoksyny tworzone przez *Fusaria* określono mianem mikotoksyn fuzaryjnych. Uważa się, iż odegrały one istotną rolę w historii, począwszy od średnio-wiecznej Europy, przez czasy kolonialne obu Ameryk,

aż do czasów obecnych. Dodatkowo wysuwano liczne hipotezy, iż mikotoksyny produkowane przez *Fusaria* mogły być przyczyną wyginięcia Etrusków czy pomoru w Atenach w V w p.n.e. [15, 60].

W środowisku naturalnym wykrywa się obecność kilku klas mikotoksyn fuzaryjnych: zearalenonu, trichotecenów, fumonizyn, moniliforminy oraz bowerycyny. Wykazują one działanie toksyczne w stosunku do mikroorganizmów, roślin, a także ludzi i zwierząt [57]. Związki te wytwarzane są przeważnie przez: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. nivale*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* [49, 52, 58]. Na terenie Polski dominują *F. culmorum*, *F. graminearum* [3, 38].

Problemy wynikające z patogenności i zdolności do syntezy mikotoksyn przez grzyby z rodzaju *Fusarium*

* Autor korespondencyjny: Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Zakład Mikrobiologii, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa; (022) 6063680, (022) 606 36 74; ibprs.ibprs@pl; suchorzynska@ibprs.pl

są jednym z ważniejszych zagadnień rolnictwa zarówno w krajach ubogich jak i bogatych. O randze tego problemu może świadczyć fakt, iż w 2006 r. Unia Europejska wprowadziła ujednolicone normy dla zawartości mikotoksyn, które najczęściej występują w produktach pochodzenia zbożowego. Ponadto coraz większe znaczenie przywiązuje się do metod mających zapobiegać zakażeniom płodów rolnych przed zbiorem [38, 57]. Ogromne znaczenie mają techniki pozwalające na wczesne wykrycie obecności patogena i określenie jego zdolności do tworzenia mikotoksyn. Są to decydujące i obecnie podstawowe elementy profilaktyki ochrony przed zanieczyszczeniem toksynami upraw rolniczych oraz uzyskiwanych z nich produktów spożywczych i paszowych [28]. W celu uniknięcia strat upraw spowodowanych tworzeniem przez patogeny mikotoksyn wykorzystuje się różne metody biologii molekularnej. Metody te umożliwiają szybkie zastosowanie środków zaradczych i unikanie skażonej żywności [3, 28].

2. Charakterystyka rodzaju *Fusarium*

2.1. Morfologia

Rodzaj *Fusarium* został utworzony w roku 1809 przez Link'a na podstawie charakterystycznych cech tj. obecność kajakowato- lub bananowato-kształtnych zarodników konidialnych [43]. Zgodnie z najnowszą systematyką [43] grzyby z rodzaju *Fusarium* zostały zaliczone do:

Gromady: *Eumycota* – Grzyby właściwe

Podgromady: *Fungi imperfecti* – Grzyby niedoskonałe

Klasy: *Hyphomycetes* – Strzępczaki

Rzędu: *Moniliales* – Moniliowce

Rodziny: *Tuberculariaceae* – Gruźelkowate

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są szeroko rozpowszechnione w glebie, szczególnie zasiedlają żyzne, urodzajne gleby, zaś stosunkowo rzadko leśne [33]. Mogą rozwijać się również na różnych częściach roślin, resztkach roślinnych i innych związkach organicznych [12].

Fusaria tworzą zarodniki bezpłciowe zwane konidiami. Wyróżnia się trzy typy zarodników: makrokonidia, mikrokonidia oraz chlamydospory [43]. Przy pomocy tych zarodników następuje rozprzestrzenianie się grzybów z wiatrem czy deszczem w środowisku naturalnym.

Makrokonidia są wielokomórkowe zaokrąglone lub wydłużone. Najczęściej przyjmują kształt sierpowaty, prosty lub grzbietowo-brzuszy. Wielkość makrokonidiów jest stosunkowo stała dla danego gatunku, dlatego wykorzystuje się je do określania przynależności do danego gatunku *Fusarium* sp.

Drugim typem zarodników są mikrokonidia, wytwarzane na pojedynczych fialidach, w rzekomych

główkach czy łańcuszkach. Przybierają kształt owalny, eliptyczny lub maczugowaty. Obecność lub brak mikrokonidiów jest cechą diagnostyczną za pomocą której można określić dany izolat do gatunku. Trzecim rodzajem zarodników są chlamydospory. Podobnie jak w przypadku mikrokonidiów ich tworzenie przez izolaty *Fusarium* sp. jest ważną cechą w identyfikacji gatunkowej. Zarodniki te mogą występować pojedynczo, w parach lub skupieniach [43, 56].

2.2. Charakterystyka ważnych gatunków *Fusarium*

2.2.1. *Fusarium culmorum*

Fusarium culmorum należy do sekcji *Discolor*. Powszechnie występuje w klimacie umiarkowanym, dominuje w rejonach chłodniejszych tj. Północna, Zachodnia Europa. Izolowany jest ze wszystkich części roślin rolniczych tj. pszenicy, jęczmienia, żyta, owsa, kukurydzy, pomidorów. Toleruje zmiany temperatury oraz może rozwijać się w warunkach małego potencjału wodnego. Syntetyzuje zearalenon oraz mikotoksyny z grupy trichotecenów w tym deoksyniwalenol, niwalenol [3, 43].

Fusarium culmorum nie tworzy stadium doskonałego. Wytwarza krótkie, grube, z mocno wygiętą częścią grzbietową makrokonidia. Makrokonidia przedzielone są zazwyczaj 3-ma lub 4-ma przegrodami. *F. culmorum* nie produkuje mikrokonidiów. Chlamydospory mogą występować pojedynczo, w łańcuszkach i skupieniach [43, 69]. Z filogenetycznego punktu widzenia jest podobny do *F. graminearum* oraz do *F. crookwellense*.

2.2.2. *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum jest kolejnym ważnym fitopatogenem. Podobnie jak *F. culmorum* należy do sekcji *Discolor*. Gatunek ten dominuje na obszarach o klimacie cieplejszym jak śródziemnomorski (Europa Południowa) czy zwrotnikowy porażając głównie zboża drobnoziarniste oraz kukurydzę [3]. Wytwarza dwa typy konidiów. Cienkie, długie makrokonidia, o kształcie sierpowatym i prostym, składające się z 5-ciu do 6-ciu przegród. Drugim typem zarodników są okrągłe chlamydospory występujące w grzybni pojedynczo, w skupieniach oraz łańcuszkach. Izolaty *Fusarium graminearum* przypominają wyglądem *F. culmorum*, *F. crookwellense* oraz *F. pseudograminearum*. Patogen ten jest zdolny do tworzenia m.in. zearalenonu, fuzaryny C oraz metabolitów z grupy trichotecenów [43].

2.2.3. *Fusarium poae*

Fusarium poae jest patogenem zaliczonym do sekcji *Sporotrichiella*, izolowanym przeważnie w klimacie umiarkowanym. Jest on czynnikiem chorobotwórczym owsa, a także jęczmienia, pszenicy czy żyta [36]. Krótkie, sierpowate przedzielone 3-ma przegrodami

makrokonidia oraz chlamydospory tworzone są bardzo rzadko. Wytwarza on głównie okrągłe, nie przedzielone przegrodami mikrokonidia na monofialidach. *F. poae* porażając wiechy i kłosa zbóż posiada zdolność tworzenia fuzaryny X, oraz trichotecenów (niwalenolu, fuzaryny X, diacetoksyscirpenolu, T-2 toksyny) [36, 43].

2.3. Choroby powodowane przez *Fusarium* sp.

Stosowane w nowoczesnym rolnictwie uprawy monokultur bez tradycyjnego płodozmianu, oszczędnościowe systemy uprawy (minimum tillage system) oraz jednostopniowy zbiór plonów skutkuje wzrostem porażenia upraw rolniczych przez patogeny [38].

Grzyby z rodzaju *Fusarium* infekują wiele upraw roślinnych, w tym zboża drobnoziarniste (pszenica, pszenżyto, żyto, jęczmień), a także kukurydzę, ziemniaki oraz wiele innych roślin ważnych dla człowieka [15, 40, 43]. Rośliny są porażane w różnych fazach rozwojowych, powodując choroby przed- i powschodowe, tj. fuzaryjna zgorzel podstawy źdźbła i korzeni, zamieranie ziarna, zgorzel siewek, fuzariozy kłosów i wiech owsa, choroby podsuszkowe czy fuzariozę kłosów pszenicy (ang. scab, FHB) [15, 36, 46, 58]. Porażone uprawy cechują się obniżoną wartością konsumpcyjną i handlową. Dodatkowo uzyskiwane plony są zanieczyszczone niebezpiecznymi dla ludzi i zwierząt mikotoksynami [15, 58, 61]. Niektóre z tych mikotoksyn jak deoksyniwalenol wywierają działanie fitotoksyczne, przejawiające się wzmożoną patogennością grzybów [66].

3. Mikotoksyny

Mikotoksyny są wtórnymi metabolitami wytwarzanymi głównie przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Choroby powodowane przez grzyby tworzące mikotoksyny to mikotoksykozy, zaś nauka zajmująca się ich badaniem nosi nazwę mikotoksykologii [6]. Mikotoksyny mogą być produkowane przez grzyby zarówno w czasie wzrostu roślin, ale także podczas ich przechowywania, transportu i przetwarzania. Ww. związki mogą wykazywać działanie fitotoksyczne, zootoksyczne. Poza tym są szkodliwe dla innych mikroorganizmów [57]. Metabolity te wykazują różne działanie toksyczne tj. cytotoksyczne, genotoksyczne, neurotoksyczne, hepatoksyczne czy immunosupresyjne. Wynika to z budowy strukturalnej tych związków, które mogą składać się od prostych pierścieni heterocyklicznych, po nieregularne 6 lub 8 członowe pierścienie [18, 57].

Związki te mogą wchodzić w sposób pośredni i bezpośrednio do łańcucha pokarmowego ludzi i zwierząt: pośrednio przez spożywanie mięsa i mleka zwierząt

skarmianych skażonymi produktami lub bezpośrednio spożywając produkty roślinne porażone przez *Fusaria* czy inne grzyby strzępkowe [24].

Obecnie do mikotoksyn zaliczono około 400 związków. Pod względem ekonomicznym i toksykologicznym w skali światowej istotne znaczenie ma 5 klas mikotoksyn: aflatoksyny, ochratoksyny, zearalenon, fumonizyny i trichoteceny [57, 67].

Aflatoksyny i ochratoksyny są wytwarzane głównie przez gatunki grzybów z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*. Grzyby te rozwijają się w czasie złego przechowywania produktów zbożowych.

Pozostałe klasy mikotoksyn są produkowane przez patogenne gatunki *Fusarium* sp. [18, 24, 57]. Mikotoksyny tworzone przez *Fusaria* określono mianem mikotoksyn fuzaryjnych [15, 60].

4. Mikotoksyny fuzaryjne

Grzyby z rodzaju *Fusarium* ze względu na patogenność oraz wysoką toksyczność stwarzają poważne problemy w nowoczesnym rolnictwie. Wśród wszystkich gatunków *Fusarium* produkujących mikotoksyny do najbardziej mikotoksynotwórczych gatunków na świecie zaliczono: *F. culmorum* i *F. graminearum*. *Fusarium culmorum* jest patogenem dominującym w regionach chłodniejszych np. w Europie Północnej, zaś *F. graminearum* w rejonach cieplejszych [24, 52, 58]. Ważne znaczenie mają również: *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* i *F. sambucinum* [49].

Fusaria są w stanie wytwarzać kilka mikotoksyn: moniliforminę, bowerycyneę, fumonizyneę, zearalenon oraz trichoteceny [23, 49]. Mikotoksyny fuzaryjne wykazują silne, zróżnicowane działanie toksyczne.

Występowanie różnych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* jest dużym problemem w rolnictwie. Wynika to z porażania roślin oraz negatywnego wpływu mikotoksyn na ich rozwój. Negatywny wpływ na rośliny przejawia się zamieraniem komórek, chlorozami, zahamowaniem wzrostu roślin, kiełkowania nasion, zamieraniem ziarna. Mikotoksyny są czynnikami wywołującymi zaburzenia w procesach mitozy i metabolizmie białkowym u roślin. Wytwarzanie mikotoksyn w strefie korzeniowej roślin uważane jest za główną przyczynę zmian w pobieraniu i rozmieszczaniu składników pokarmowych w roślinie m.in. na skutek zahamowania rozwoju korzeni i włośników. Może również wpływać niekorzystnie na proces mikoryzy [9].

Związki te kumulują się w zainfekowanych komórkach roślinnych i w ten sposób mogą także dostawać się do łańcucha pokarmowego ludzi i zwierząt [57, 67]. Mogą wówczas być przyczyną poważnych chorób, jak hyperestrogenizm, rozmiękania leukodystroficznego upośledzeń wątroby, nerek, a także nowotworów

(przełyku, wątroby) [3, 57]. W dodatku produkty zbożowe są coraz częściej wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym [36].

Ze względu na powszechność występowania w środowisku naturalnym, wynikające z tego niebezpieczeństwo dla ludzi i zwierząt oraz straty gospodarcze za najważniejsze mikotoksyny fuzaryjne uznano trichoteceny oraz zearalenon [49].

4.1. Bowerycyna, moniliformina, fumonizyny

Bowerycyna (BEA) została odkryta jako naturalne zanieczyszczenie kukurydzy we Włoszech, Austrii, Polsce oraz Afryce Południowej. Jest syntetyzowana przez *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. semitectum* [44]. Ten cykliczny heksapeptyd wykazuje specyficzną aktywność inhibicji acetylotransferazy cholesterolu. Może powodować apoptozę komórek i fragmentację DNA. BEA posiada aktywność owadobójczą i jest wysoce toksyczna dla larw *Artemia salina* [59].

Moniliformina (MON) jest wytwarzana przez *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* i *F. oxysporum* [65]. Moniliformina jest silnie kardiotoxyczną mikotoksyną. Długotrwałe spożywanie produktów zanieczyszczonych tą toksyną jest czynnikiem powodującym wady serca [24, 55].

Fumonizyny produkowane są przez *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. napiforme*. Zostały podzielone na trzy grupy A, B, C, na podstawie różnic w strukturze chemicznej. Do najważniejszych fumonizyn należy fumonizyna B1, fumonizyna B2 i fumonizyna B3 [39, 50]. Fumonizyny stanowią powszechne zanieczyszczenie produktów konsumpcyjnych i pasz otrzymywanych z kukurydzy, w takich regionach jak Chiny, Europa, Afryka Południowa i Ameryka Północna. Działanie tych mikotoksyn zostało skorelowane z metabolizmem sfingolipidów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego w komórkach roślinnych, różnicowaniem i zamieraniem komórek, indukowaniem stresu oksydacyjnego [16, 57, 60, 67].

4.2. Zearalenon

Zearalenon (ZEA) tworzony jest głównie przez *F. culmorum* i *F. graminearum*. Sklasyfikowano go jako niesterydowy estrogen lub mikoestrogen, zwany czasami fitoestrogenem. Zredukowana forma zearalenonu, zwana zearalenolem wykazuje zwiększoną aktywność estrogeniczną. Obecność mikotoksyny w roślinach powoduje zmiany w różnicowaniu kalusa pszenicy oraz rozwoju generatywnym roślin. U zwierząt, które były karmione zanieczyszczoną paszą może skutkować uszkodzeniami organów rozrodczych oraz zakłóceniami reprodukcyjnymi [6, 24, 51, 57].

4.3. Trichoteceny

Trichoteceny stanowią rodzinę pochodnych ponad 60 seskwiterpenoidów, które są wytwarzane przez liczne rodzaje grzybów tj. *Fusarium*, *Myrothecium* czy *Trichoderma* [6]. Trichoteceny zostały podzielone pod względem budowy na 4 grupy: A, B oraz C i D. W środowisku powszechnie występują trichoteceny należące do grupy A (T-2 toksyna, HT-2 toksyna oraz diacetoksyscirpenol i neosolaniol) oraz B (deoksyniwalenol oraz jego pochodne, niwalenol i fuzaryna X) [20, 57]. Trichoteceny z grupy B posiadają grupę funkcyjną, ketonową w pozycji węgla C-8, natomiast związki z grupy A posiadają w tym miejscu inną grupę tlenową [24].

Ze względu na częstotliwość występowania w produktach pochodzenia roślinnego przeznaczonych na cele spożywcze i paszowe uważa się, iż trichoteceny z grupy B wywierają większy wpływ na człowieka i środowisko. Zaś w tej grupie do najważniejszych mikotoksyn zalicza się deoksyniwalenol (DON, womitoksyna) i jego pochodne (3AcDON i 15AcDON) oraz niwalenol (NIV) [3, 6, 38].

4.3.1. Trichoteceny z grupy B

Deoksyniwalenol oraz niwalenol produkowane są głównie przez *F. culmorum*, *F. graminearum*, a także przez *F. poae* [24]. Z przeprowadzonych badań wynika, iż niwalenol wykazuje aż o 14 razy większą toksyczność w stosunku do deoksyniwalenolu. Jednakże niwalenol jest mniej toksyczny od trichotecenów z grupy A [68].

Działanie fitotoksyczne DON-u i NIV-u oraz ich pochodnych przejawia się hamowaniem kiełkowania nasion, hamowaniem wzrostu korzeni i pędów, redukcją świeżej masy organów roślinnych, więdnieniami, chlorozami i nekrozami. Spożywanie zakażonej żywności przez zwierzęta i ludzi prowadzi do zaburzeń: układu pokarmowego, rozrodczego czy immunologicznego. Poza tym związki te powodują istotne zmiany na poziomie komórkowym, obniżając aktywność białek i enzymów oraz hamując ich syntezę. Powodują zaburzenia w przepuszczalności błon komórkowych. Mikotoksyny te ingerują w fazy inicjacji, elongacji i terminacji, przyczyniają się też do indukcji aberracji chromosomowych, zaburzeń mitozy, a także apoptoz i nekroz [6, 9, 23, 24, 49, 57, 67, 71].

4.3.2. Trichoteceny z grupy A

Związki te są wytwarzane przez *F. poae* oraz *F. sporotrichioides*. T-2 toksyna i diacetoksyscirpenol (DAS) wykazują działanie cytotoxyczne, immunosupresyjne [24].

5. Występowanie mikotoksyn fuzaryjnych w Polsce i na świecie

Uprawy roślinne w tym uprawy zbóż drobnoziarnistych mogą być infekowane przez wiele gatunków *Fusarium*. Istotne znaczenie ma to na terenach, gdzie z jednej strony panują warunki klimatyczne dogodne dla wzrostu różnych gatunków *Fusarium*, z drugiej zaś zmienne warunki klimatyczne przyczyniające się do rozwoju różnych gatunków *Fusarium* w każdym roku uprawy. Do najczęściej występujących *Fusarium* na świecie należą *F. culmorum* oraz *F. graminearum* [38, 49].

Fusarium culmorum przeważa w regionach o klimacie umiarkowanym, np. morskim, charakteryzującym się średnimi temperaturami w ciągu lata (Niemcy, Holandia, Skandynawia, Polska). *Fusarium graminearum* dominuje na obszarach o klimacie cieplejszym, gdzie odnotowywane są wysokie temperatury w okresie letnim (Ameryka Północna), śródziemnomorskim (Europa Południowa) i zwrotnikowym (Chiny) [3]. Grzyby te zdolne są do syntezy najważniejszych mikotoksyn: deoksyniwalenolu i jego pochodnych (15-AcDON, 3-AcDON) oraz niwalenolu. Patogeny wytwarzające 3-AcDON są bardziej pospolite w Europie i Azji, natomiast tworzące 15-AcDON w Ameryce Północnej i Południowej. Na początku XXI wieku wyizolowano w Kanadzie *Fusaria* zdolne do syntezy zarówno 3- i 15-AcDON. Deoksyniwalenol (DON) jest najczęściej wykrywany na pszenicy, jęczmieniu, kukurydzy i owsie, zaś rzadziej w życie i ryżu.

Niwalenol (NIV) jest powszechnie syntetyzowany przez izolaty grzybów rozwijających się w Japonii, rzadko wykrywany w Ameryce Północnej i Południowej [42, 57].

Na terenie Polski występują grzyby produkujące wszystkie rodzaje mikotoksyn fuzaryjnych. Stężenie tych mikotoksyn jest jednak znacznie niższe w produktach zbożowych niż w krajach Europy Zachodniej i Północnej. *Fusaria* tworzące DON oraz NIV izolowane są głównie na pszenicy, pszenżycie, życie i kukurydzy. Wysokie stężenie moniliforminy wykryto na pszenicy, pszenżycie oraz owsie, a fumonizyn na kukurydzy [3, 38].

6. Najważniejsze czynniki środowiska związane z tworzeniem mikotoksyn

Mikotoksyny mogą być wytwarzane przez grzyby zarówno w czasie przed- i późnym, podczas przechowywania, transportu i przetwarzania. Tworzenie tych związków powiązane jest ze stresem roślin, nadmiernym uwodnieniem magazynowanych produktów. Niewłaściwą praktyką przechowywania i niską jakością

produktów zbożowych [17]. Grzyby produkujące mikotoksyny rozwijają się w temperaturze o zakresie 10–40°C, przy pH 4–8, na suchej powierzchni [41] lub na produktach zbożowych o wilgotności 12–13%. Udowodniono, iż optymalne warunki dla wzrostu grzybów nie muszą być najlepszymi dla syntezy mikotoksyn [34]. Związki te mogą być tworzone w trudnych warunkach dla wzrostu grzyba. Dowiedzono iż, stosowanie środków grzybobójczych nie wpływa hamująco na wytwarzanie mikotoksyn, a może powodować efekt odwrotny. Pod wpływem fungicydów grzyby mogą być poddane nadmiernemu szokowi, co skutkuje zwiększoną produkcją mikotoksyn [10, 27].

7. Geny warunkujące formowanie zearalenonu i trichotecenów

Przeprowadzone badania biochemiczne i genetyczne nad gatunkiem *Fusarium sporotrichioides* umożliwiły zidentyfikowanie wielu genów zaangażowanych w biosyntezę mikotoksyn [70]. Powiązano syntezę trichotecenów z kompleksem szlaków który rozpoczyna się od związku, zwanego trichodienem i zawiera dużą liczbę reakcji chemicznych tj. utlenienie, cyklizacje czy estryfikacje [21].

Wiele genów związanych z produkcją trichotecenów zostało zidentyfikowanych wewnątrz 26-kpz segmentu DNA [11]. Wyróżniono 16 genów biorących udział w syntezie trichotecenów, większość z nich tworzy zgrupowanie genów określonych mianem zbioru *Tri*. Znajdują się w nim geny wykazujące szczególny wpływ na formowanie trichotecenów. Są to *Tri5*, *Tri7*, *Tri13* oraz *Tri3* [1, 2]. Poza zbiorem genów *Tri* znajdują się tam 4 inne geny wpływające na syntezę trichotecenów [24, 49].

Na przełomie ostatnich kilku lat zauważono silne oddziaływanie zearalenonu na środowisko [36]. Dlatego rozpoczęto doświadczenia z wykorzystaniem różnych metod molekularnych na detekcję genów biorących udział w formowaniu zearalenonu [26, 45]. Zearalenon powstaje w szlaku octanowo-polimalonianowym [22]. Wykazano, iż w jego syntezie bierze udział wiele genów, które kodują enzymy określane mianem syntaz poliketydowych (PKSs) [8]. Geny te zostały zaliczone do typu I syntaz poliketydowych (PKSs). Dzieli się je na redukujące PKS i nie-redukujące geny PKS wśród których najważniejsze to PKS4 i PKS13.

7.1. Charakterystyka *Tri5*, *Tri7*, *Tri3* i *Tri13*

Gen *Tri5* koduje enzym syntazę trichodienu, katalizujący cyklizację i izomeryzację fosforanu furanylu do trichodienu. Jest on pierwszym genem biorącym

udział w biosyntezie trichotecenów. Jeżeli gen *Tri5* jest nieobecny w genomie wówczas grzyby nie są zdolne do syntezy trichotecenów [24].

Geny *Tri7* i *Tri13* kontrolują typ powstającej mikotoksyny [69]. Z badań Lee i in. oraz Brown' a i in. wynika, iż gen *Tri7* powoduje acetylację niwalenolu i jego przemianę do 4-acetyloniwalenolu (4-ANIV) [11, 42]. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, iż grzyby posiadające niefunkcjonalny gen *Tri7* nie są zdolne do syntetyzowania NIV, ani jej pochodnej 4-ANIV [32].

Gen *Tri13* powoduje konwersję DON w NIV. Jeśli nastąpią zaburzenia ekspresji tego genu grzyby nie są zdolne do syntezy niwalenolu [11, 42], natomiast tworzą deoksyniwalenol [14]. Gen *Tri3* odpowiada za tworzenie pochodnych deoksyniwalenolu, powodując jego acetylację w pozycji 3 lub 15 [62].

7.2. Charakterystyka PKS4 i PKS13

Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy syntezą zearalenonu, a aktywnością jednego genu, oznaczonego jako PKS4. Uważa się, iż obecność genu PKS4, świadczy o potencjalnej zdolności do syntezy zearalenonu przez izolaty *Fusarium* sp. PKS4 koduje enzym, który stymuluje ekspresję innego genu PKS13 niezbędnego w syntezie zearalenonu. Białko kodowane przez gen PKS13, bierze udział w końcowym etapie formowania zearalenonu. Powoduje przyłączenie jednostki węglowej do końcowego związku pośredniego [26, 45].

8. Metody molekularne

Ogromne znaczenie mają techniki pozwalające na wczesne wykrycie obecności patogenu i określenie jego zdolności do tworzenia mikotoksyn. Są to decydujące i obecnie podstawowe elementy profilaktyki ochrony przed zanieczyszczeniem toksynami produktów spożywczych i paszowych [28]. W celu uniknięcia strat upraw spowodowanych występowaniem patogenów wykorzystuje się różne metody biologii molekularnej. Metody te umożliwiają szybkie zastosowanie środków zaradczych i unikanie skażonej żywności [3, 28, 29, 30]. Opierają się one na analizie struktury DNA, a wyniki z analiz molekularnych nie zależą od stanu fizjologicznego badanego organizmu. Metody te pozwalają na łatwiejszą oraz szybszą ocenę mikotoksynotwórczości w porównaniu do tradycyjnych metod [3, 53].

8.1. Metody detekcji i identyfikacji oparte na procedurze PCR

Opracowanie w 1974 r. przez Kary Mullis' a techniki służącej do specyficznego powielania sekwencji określonych odcinków DNA, stało się początkiem rozwoju dużej liczby badań w patologii roślin [19].

Metoda reakcji łańcuchowej polimerazy PCR znalazła wiele zastosowań m.in. w klasyfikacji izolatów grzybów, badań interakcji gospodarz-patogen. Szczególny rozwój tej techniki nastąpił po 1988 r., kiedy wykorzystano po raz pierwszy enzym polimerazę z bakterii *Thermus aquaticus* (*Taq*), wykazującą stabilność w wysokich temperaturach [31].

Wśród licznych metod molekularnych służących do wykrywania, identyfikacji i klasyfikacji patogenów są stosowane są obecnie techniki tj. SCAR, RT-PCR, Real-time PCR.

8.1.1. SCAR

Metoda SCAR (specyficzny PCR) polega na powielaniu za pomocą pary starterów ściśle zdefiniowanego obszaru genomu [5]. Startery, które są wykorzystywane w tej technice mogą być uzyskane z badań metodą RAPD, a ich długość wynosi 17–24 nukleotydów [28].

Analiza SCAR jest metodą bardzo przydatną w identyfikacji, wykrywaniu i charakteryzowaniu patogenicznych grzybów z rodzaju *Fusarium*. Stosowana jest jako analiza porównawcza genomów organizmów, do ustalania lub weryfikowania przynależności gatunkowej badanych izolatów [28].

SCAR jest wykorzystywany do wykrywania określonych genów w populacjach grzybów. Ma to szczególne znaczenie w kontekście właściwości patogenów tj. różnorodna patogeniczność oraz zdolności do syntezy mikotoksyn.

Za pomocą starterów zaprojektowanych na podstawie fragmentów genów odpowiedzialnych za formowanie wielu mikotoksyn w tym, trichotecenów można dokonać rozróżnienia izolatów zdolnych do syntezy tych związków. W takich badaniach wykorzystuje się startery ułożone m.in. na genach *Tri5*, *Tri7* [14, 32, 30]. Na podstawie sekwencji genów PKS4 i PKS13 można określić potencjalną zdolność grzybów do syntezy zearalenonu [45]. Przykładowe pary starterów pozwalające na analizę genów biorących udział w syntezie trichotecenów i zearalenonu zamieszczono w tabeli I.

8.1.2. RT-PCR

RT-PCR (Reverse-transcription – PCR) jest metodą wykorzystującą enzym odwrotną transkryptazę do przemiany RNA w cDNA przez amplifikację PCR. Analiza RT-PCR umożliwia zbadanie aktywności genu i stanowi ważny krok do zrozumienia jego funkcji, działania i aktywności [4, 48].

Technika RT-PCR pozwala badaczom w jasny sposób stwierdzić, czy dany grzyb wykazuje aktywność produkcji mikotoksyn. Określenie jej jest możliwe przez detekcję (mRNA) dla transkryptu genów zaangażowanych w formowanie metabolitów wtórnych. Jeśli geny biosyntezy mikotoksyn ulegają transkrypcji wówczas dany metabolit jest wytwarzany [24].

Tabela I
Wybrane startery wykorzystywane w technice SCAR do detekcji genów Tri5, Tri7 oraz PKS4 i PKS13

Gen	Piśmien- nictwo	Para starterów	Sekwencja starterów	Wielkość produktu
Tri5	[25]	HA <i>Tri</i> F	5'-CAGATGGAGAAGTGGATGGT-3'	260pz
		HA <i>Tri</i> R	5'-GCACAAGTGCCACGTGAC-3'	
Tri7	[14]	M_ <i>Tri</i> 7F	5'-TGGATGAATGACTTGAGTTGACA-3'	483pz
		M_ <i>Tri</i> 7R	5'-AAAGCCTTCATTCACAGCC-3'	
PKS4	[45]	PKS4 F	5'-AGATGGCCATGGTGTCTCGTGAT-3'	400 pz
		PKS4R	5'-GTGGGCTTCGCTAGACCGTGAGTT-3'	
PKS13	[45]	PKS13F	5'-AGCCGGGAAAGCCATACCATACAT-3'	400pz
		PKS13R	5'-GCTTGCAATCTCGATCGCCATAAT-3'	

Analiza RT-PCR została szeroko wykorzystana w genetyce grzybów do kontroli ekspresji specyficznych genów pod działaniem różnych warunków fizjologicznych [4].

RT-PCR został także użyty do monitorowania ekspresji genów mikotoksyn powiązanych z syntezą trichotecenów [37] oraz zearalenonu [45]. W tabeli II zamieszczono przykładowo stosowane startery w metodzie RT-PCR.

8.1.3. Real-Time PCR

Real-Time PCR jest techniką, która w czasie przeprowadzania analizy umożliwia mierzenie powstających produktów automatycznie po każdym cyklu reakcji w zamkniętych probówkach za pomocą specjalnych sond DNA [4, 24, 64].

Bezpośredni pomiar gromadzonego produktu pozwala na kontrolę faz w czasie trwania reakcji. Początkowa ilość badanego DNA w analizie może być powiązana z liczbą cykli, w której obserwowany jest znaczący wzrost fluorescencji [4]. Produkty PCR mogą być monitorowane przy użyciu zarówno fluorescencyjnych, interkalujących barwników DNA tj. SYBR Green lub sekwencję specyficznej sondy nukleotydowej. Przykładem może być sonda *TaqMan*, która obecnie jest najpowszechniej stosowana w tej

metodzie [4]. Burlakoti i in. przeprowadzili badania z wykorzystaniem tej techniki dowodząc tym samym jej zastosowanie w analizach mikotoksynotwórczości [13].

Analiza Real-Time PCR wraz ze specyficznymi starterami i sondą *TaqMan* umożliwiła ocenę wytwarzania trichotecenów różnych gatunków *Fusarium* sp., w tym *F. graminearum* z ziarna jęczmienia [63].

Uważa się, iż ilościowy Real-Time PCR jest prawdopodobnie w obecnych czasach najlepszą metodą do detekcji grzybów syntetyzujących mikotoksyny [29, 35, 54].

Przykładowe sekwencje starterów wykorzystywanych w tej technice znajdują się w tabeli III.

9. Podsumowanie

Grzyby z rodzaju *Fusarium* uznano za najniebezpieczniejsze patogeny wywołujące poważne choroby u roślin, a także ludzi, zwierząt. W dodatku są one zdolne do syntezy wysoce toksycznych związków zwanych mikotoksynami. Najczęściej występujące w środowisku to zearalenon oraz trichoteceny, w tym deoksyniwale-nol. Związki te są przyczyną zaburzeń we wzroście i rozwoju roślin, a także chorób związanych z układem

Tabela II
Wybrane startery używane do identyfikacji genów odpowiedzialnych za syntezę mikotoksyn w technice RT-PCR [wg 45]

Gen	Para starterów	Sekwencja starterów
PKS4	PKS4-1	5'-AGATGGCCATGGTGTCTCGTGAT-3'
	PKS4-2	5'-GTGGGCTTCGCTAGACCGTGAGTT-3'
PKS13	PKS13-1	5'-AGCCGGGAAAGCCATACCATACAT-3'
	PKS13-2	5'-GCTTGCAATCTCGATCGCCATAAT-3'
PKS14	PKS14-1	5'-AGGGCTCGATTGTTGCGGATTCT-3'
	PKS14-2	5'-TTCTTCCC GCCACTTCAAACA-3'

Tabela III

Wybrane startery stosowane do detekcji genów biorących udział w syntezie mikotoksyn w technice Real-Time PCR

Gen	Piśmiennictwo	Para starterów	Sekwencja starterów	Wielkość produktu
Tri5	[13]	Tri5-F	5'-TCTTAACACTAGCGTGCGCCTTCT-3'	193pz
		Tri5-R	5'-CATGCCAACGATTGTTTGGAGGGA-3'	193pz
Pks4	[45]	PKS4-PS.1	5'GTGGGCTTCGCTAGACCGTGAGTT3'	400pz
		PKS4-PS.2	5'ATGCCCTGATGAAGAGTTTGAT3'	400pz
PKS13	[45]	PKS13-PS.1	5'CCCCAACTCGACGTCAAATCTAT 3'	400pz
		PKS13-PS.2	5'TTCTTCCCGCCGACTTCAAAAACA3'	400pz

pokarmowym, rozrodczym czy odpornościowym u ludzi i zwierząt. Za tworzenie trichotecenów i zearalenonu odpowiedzialnych jest szereg genów. Istotną rolę w biosyntezie trichotecenów odgrywają geny *Tri5*, *Tri7*, a w syntezie zearalenonu geny *PKS4* i *PKS13*. Metody molekularne oparte o reakcję PCR umożliwiają dokonanie szybkiej oceny mikotoksynotwórczości wśród grzybów strzępkowych. Do powszechnie stosowanej metody molekularnej ze względu na prostotę wykonania należy SCAR. Coraz częściej stosowane są badania z wykorzystaniem technik Real-Time PCR i RT-PCR, które pomimo wysokich kosztów analiz cechują się wysoką wrażliwością, większą powtarzalnością i mniejszą pracochłonnością.

Piśmiennictwo

- Alexander N.J., McCormick S.P., Hohn T.M.: *Tri12*, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides* gene isolation and expression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 977–984 (1999)
- Alexander N.J., McCormick S.P., Larson T.M., Jurgenson J.E.: Expression of *Tri15* in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr. Genet.* **45**: 157–162 (2004)
- Arseniuk E., Góral T.: Fuzarioza kłosów – czynniki sprawcze i gospodarcze znaczenie choroby. IHAR w Radzikowie. www.pin.org.pl/hrin/txt/2005/3-6.rtf (2005)
- Atkins S.D., Clark I.M.: Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.* **45**, 3–15 (2004)
- Bednarek P.T., Chwedorzewska K.: Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin. *Biotechnologia*, **1**, 9–34 (2001)
- Bennet J.W., Klich M.: Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 497–512 (2003)
- Berg J., Tymoczko J.L., Stryer L.: Poznanawanie genów. [w:] *Biochemia*, Wyd. V. Wyd. Naukowe PWN SA, Warszawa 2005, str. 149–151.
- Bingle L.E., Simpson T.J., Lazarus C.M.: Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet. Biol.* **26**, 209–223 (1999)
- Bis H.: Uzdolnienia do produkcji mikotoksyn grzybów wyizolowanych z gleb Krakowa i jego okolic. *Zesz. Nauk. Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Rolnictwo)*, **89/546**, 43–50 (2006)
- Boyacioglu D., Hettiarachchy N.S., Stack R.W.: Effect of three astemic fungicides on deoxynivalenol (vomitoxin) production by *Fusarium graminearum* in wheat. *Can. J. Plant Sci.* **72**, 93–101 (1992)
- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H., Desjardins A.E.: A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **32**, 121–133 (2001)
- Burgess L.W.: General ecology of the *fusaria*. p. 225–235 [In:] Nelson P. E., Toussoun T. A., Cook R. J., (ed): *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Penn. State University Press, University Park, 1081
- Burlakoti R.R., Estrada R., Rivera V.V., Boddada A., Secor G.A., Adhikari T.B.: Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet and wheat. *Phytopatol.* **97**, 835–841 (2007)
- Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P.: Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and charakterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62**, 355–367 (2003)
- Chełkowski J.: Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i mikotoksykozy. Wyd. SGGW-AR, Warszawa 1985
- Cole R.J., Jarvis B.B., Schweikert M.A.: Handbook of secondary fungal metabolites, vol. III. Acad. Press, New York 2003
- Coulumbe R.A.: Symposium biological action of mycotoxins. *J. Dairy Sci.* **76**, 880–891 (1993)
- Creppy E.E.: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxycol. Lett.* **127**, 19–28 (2002)
- Czembor P.Cz.: Markery PCR w badaniach grzybów fitopatogenicznych. IHAR, Radzików 1995, s. 151–163
- Desjardins A.E., 2006: *Fusarium* mycotoxins chemistry, Genetics and Biology. Am. Phytopathol. Soc.Press, St. Paul, MN. 2006
- Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P.: Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species chemistry, genetics, and significance. *Microbiol. Rev.* **57**, 595–604 (1993)
- Dewick P.N.: The acetate pathway: fatty acids and polyketides, p. 35–117. In P.N. Dewick (ed.), *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*, 2nd ed. John Wiley & Sons LDT, West Sussex, England, 2001
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C.: *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Tech.* **80**, 183–205 (1999)

24. Edwards S.G., O'Callaghan J., Dobson D.W.: PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi-review. *Mycol. Res.* **106**, 1005–1025 (2002)
25. Edwards S.G., Pirgozliev S.R., Hare M.C., Jenkinson P.: Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1575–1580 (2001)
26. Gaffoor I., Trail F.: Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1793–1799 (2006)
27. Gareis M., Ceynowa J.: Influence of the fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. *Lebensmittel-Untersuchung-Forsch.* **198**, 244: 248 (1994)
28. Golińska B., Narożna D., Mądrzak C.J.: Zastosowanie metod molekularnych do wykrywania, identyfikacji i charakterystyki grzybów z rodzaju *Fusarium*. *Biotechnologia*, **3**, 165–177 (2002)
29. Halstensen A.S.: Species-specific fungal DNA in airborne dust as surrogate for occupational mycotoxin exposure. *Int. J. Mol. Sci.* **9**, 2543–2558 (2008)
30. Halstensen A.S., Nordby K.CH., Klemsdal S.S., Elen O., Clasen P.E., Eduard W.: Toxigenic *Fusarium* spp. As determinants of trichothecene mycotoxins in settled grain dust. *J. Occup. Environ. Hyg.* **3**, p. 651–659 (2006)
31. Henson J.M., French R.: The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 81–109 (1993)
32. Jennings P., Coates M.E., Tuner J.A., Chandler E.A.: Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathol.* **53**, 182–190 (2004)
33. Jeschke N., Nelson P.E., Marasas W.F.O.: *Fusarium* species isolated from soil samples collected at different altitudes in the Transkei, Southern Africa. *Mycol.* **82**, 727–733 (1990)
34. Joffe A.Z.: *Fusarium* species: their biology and toxicology. John Wiley & Sons, New York 1986, s. 225–298
35. Keswani J., Kashon M.L., Chen B.T.: Evaluation of interference to conventional and real-time PCR for detection and quantitation of fungi in yeast. *J. Environ. Monit.* **7**, 311–318 (2005)
36. Kiecana I., Mielniczuk E., Perkowski J., Goliński P.: Porażenie wiech przez *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie owsa. *Acta Agrobotanica*, **58**, 91–102 (2005)
37. Kimura M., Kaneko I., Komiyama M., Takatsuki A., Koshino H., Yoneyama K., Yamaguchi I.: Trichothecene 3-O-acetyltransferase protect both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterisation of *Tri101*. *J. Biol. Chem.* **273**, 1654–1661 (1998)
38. Kobras M., Horoszkiewicz-Janka J.: Znaczenie i możliwości ograniczenia szkodliwych metabolitów pochodzenia grzybowego. *Progr. Plant Protect.* **47**, 141–148 (2007)
39. Krska R., Welzig E., Boudra H.: Analysis of *Fusarium* toxins in feed: review. *Anim. Feed Sci. Tech.* **137**, 241–264 (2007)
40. Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P.: Flora polska. Grzyby (Mycota). Instytut Botaniki PAN, Warszawa, 1991
41. Lacey J.: Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops. str. 363–397. [In:] Smith J. E., Henderson R. E., (Eds.), *Mycotoxins Anim. Foods*. CRC Press, Boca Raton, 1991
42. Lee T., Han Y.-K., Kim K.-H., Yun S.-H., Lee Y.-W.: *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2148–2154 (2002)
43. Leslie J.F., Summerell B.A.: The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Pub. Prof. first ed., 2006
44. Logrieco A., Moretti A., Castella G., Kostecki M., Goliński P., Ritieni A., Chełkowski J.: Beauvericin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3084–3088 (1998)
45. Lysoe E., Klemsdal S.S., Bone R., Frandsen R.J.N., Johansen T., Thrane U., Giese H.: The PKS4 gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3924–3932 (2006)
46. Łacicowa B., Wagner A.: Grzyby towarzyszące *Gaumannomyces graminis* w tkankach pszenicy i pszenżyta. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* **374**, 242–255 (1989)
47. Ławiecki T., Kobras M.: Reakcje wybranych odmian jęczmienia browarnego na porażenie kłosów grzybami z rodzaju *Fusarium*. *Progr. Plant Pathol.* **42**, 869–871 (2002)
48. Łojkowska E.: Diagnostyka molekularna roślin. [w:] „Biotechnologia roślin”. Red. Malepszy S., Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001, s. 462–485
49. Magan N., Hope R., Collete A., Baxter E.S.: Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**, 685–690 (2002)
50. Marcidska I., Biegasa-Kościelniak J.: Wpływ zearalenonu, GA3 i kinetyny na proces różnicowania kalusa pszenicy oraz rozwój generatywny zregenerowanych roślin. *Curr. Tops. Biophys.* **22**, A-92 (1999)
51. Marasas W.F.O., Miller J.D., Riley R.T., Visconti A.: Fumonisin-occurrence, toxicology, metabolism and risk assessment, p. 332–359. [In:] Summerell B. A., Leslie J. F., Backhouse D., Bryden W. L., Burgess L. W. (ed.), *Fusarium*. Nelson P. E., Memorial Symposium. APS Press, St Paul, Minn., 2001
52. Miller J.D.: Epidemiology of *Fusarium graminearum* diseases of wheat and corn. In: Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxins (Miller J.D., Trenholm H.L., eds.) Eagon Press, St Paul, MN., 1994, str. 19–36
53. Mitchell T.G., Sandin R.L., Bowman B.H., Meyer W., Merz W.G.: Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. *J. Med. Vet. Myc.* **32**, 351–366 (1994)
54. Morrison E., Kosiak B., Ritieni A., Aastveit A.H., Uhlig S., Bernhoft A.: Mycotoxin production by *Fusarium avenaceum* strains isolated from Norwegian grain and the cytotoxicity of rice culture extracts to porcine kidney epithelial cells. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3070–3075 (2002)
55. Nagaraj R.Y., Wu W., Will J.A., Vesonder R.F.: Cardiotoxicity of moniliformin in broiler chickens as measured by electrocardiography. *Poultry Sci.* **74**, 1–21 (1995)
56. Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie J.: Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 479–504 (1994)
57. Packa D.: Mikotoksyny zagrożeniem dla ludzi, zwierząt i roślin. *Rolnicze ABC*, **11**, 5–6 XI (2006)
58. Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L.: *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathol.* **44**, 207–238 (1995)
59. Pascale M., Visconti A., Pronczuk M., Wiśniewska H., Chełkowski J.: Accumulation of fumonisins, beauvericin and fusaproliferin in maize hybrids inoculated under field conditions with *Fusarium proliferatum*. *Mycol. Res.* **106**, 1026–1030 (2002)

60. Pittet A.: Natural occurrence of mycotoxins in food and feeds an updated. *Rev. Med. Vet.* **149**, 479–492 (1998)
61. Polley R.W., Turner J.A.: Surveys of stem base diseases and *Fusarium* ear diseases in winter wheat in England, Wales and Scotland, 1989–1990. *Ann. Appl. Biol.* **126**, 45–59 (1995)
62. Quarta A., Mita G., Haidukowski M., Santino A., Mule G., Visconti A.: Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Eur. Food Addit. Contamin.* **22**, 309–315 (2005)
63. Sarlin T., Yli-Mattila T., Jestoi M., Rizzo A., Paavani-Huhtala S., Haikara A.: Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. *Eur. J. Plant Pathol.* **114**, 371–380 (2006)
64. Schena L., Franco N., Ippolito A., Gallitelli D.: Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**, 893–908 (2004)
65. Schutt F., Nirenberg H.J., Deml G.: Moniliformin production in the genus *Fusarium*. *Mycotoxin Res.* **14**, 35–40 (1998)
66. Snijders C.H.A., Krechting C.F.: Inhibition of deoxynivalenol translocation and fungal colonization in *Fusarium* head blight resistant wheat. *Can. J. Bot.* **70**, 1570–1576 (1992)
67. Stępień M., Sokół-Leszczyńska B., Łuczak M.: Mykotoksyny, produkty spożywcze a zdrowie człowieka. *Post. Mikrobiol.* **46**, 167–177 (2007)
68. Ueno Y.: Trichothecenes: chemical, biological and toxicological aspects. Elsevier, Amsterdam, 1983
69. Wagacha J.M., Muthomi J.W.: *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and other role in pathogenesis in wheat-review. *Crop Protection*, **26**, 877–885 (2007)
70. Ward T.J., Bielawski J.P., Kistler H.C., Sullivan E., Nell K.: Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9278–9283 (2002)
71. Williams K.C., Blaney B.J.: Effect of the mycotoxins, nivalenol and zearalenone, in maize naturally infected with *Fusarium graminearum* on the performance of growing and pregnant pigs. *Aust. J. Agr. Res.* **45**, 1265–1279 (1994)

Spis treści

Profesor Stefan Kryński (1914–2009)	177
M. Czerkies, A. Raczkowska, K. Brzostek – <i>Quo vadis Yersinia pestis?</i> Ewolucja patogennych gatunków z rodzaju <i>Yersinia</i>	181
M. Solarska, A. Midak-Siewirska, T. Dzieciatkowski – Biegunki o etiologii wirusowej	197
P. Godzik – System replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) <i>in vitro</i>	207
M. Pawlikowska, W. Deptuła – Białka szoku termicznego (HSPs – heat shock proteins), a chlamydiozy i chlamydofilozy	213
M. Suchorzyńska, A. Misiewicz – Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatoge- niczne rodzaju <i>Fusarium</i> i ich wykrywanie technikami PCR	221

Contents

Profesor Stefan Kryński (1914–2009)	177
M. Czerkies, A. Raczkowska, K. Brzostek – <i>Quo vadis Yersinia pestis?</i> The evolution of pathogenic species of the genus <i>Yersinia</i>	181
M. Solarska, A. Midak-Siewirska, T. Dzieciatkowski – Viruses causing gastroenteritis	197
P. Godzik – <i>In vitro</i> hepatitis C virus (HCV) replication system	207
M. Pawlikowska, W. Deptuła – Heat shock proteins (HSPs) and chlamydiosis and chlamydophilosis	213
M. Suchorzyńska, A. Misiewicz – Mycotoxigenic phythopathogenic fungi of <i>Fusarium</i> genus and their identification by PCR techniques	221

ERRATA

W zeszytce 2, tom 48 (2009) w tekście „prof. Ludwik Hirsfeld”
na str 151, II szpalta, wiersz 19 od dołu
jest: **do 1930 roku**;
powinno być: **do 1939 roku**.