

Kwartalnik

**Tom 49**

**Zeszyt 2 • 2010**

CODEN:

PMKMAV 49 (2)

2010

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Punktacja za publikację naukową wg MNiSW: 4.0

Index Copernicus ICV = 9,00 (2009)

**Od 2009 r. *Postępy Mikrobiologii* znajdują się  
na listach czasopism *Thomson Scientific:*  
*Science Citation Index Expanded (ISI)* oraz  
*Journal Citation Reports (JCR) / Science Edition***

<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. (22) 554 13 05/304, fax (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. (22) 628 08 22, (22) 621 13 51  
e-mail: zmf@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: (91) 46 616 51, 52, lub fax: (91) 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)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

**Informacja o zdjęciu na okładce:** Komórki *Clostridium taeniosporum*\*, SEM,  
autor: Shing-Yi Yang, Alexandra Blinkova i James R. Walker, Uniwersytet Teksasński w Austin, USA  
\* *C. taeniosporum* wyizolowany przez Krasnikowa w roku 1968, ostatnio opisany przez J.R. Walkera  
i wsp. w *Mol. Microb.* **63**, 629–643 (2007) i w *Anaerobe* **14**, 308–324 (2008)

**Information about the cover picture:** Cells of *Clostridium taeniosporum*\*, SEM,  
author: Shing-Yi Yang, Alexandra Blinkova i James R. Walker, Uniwersytet Texas at Austin, USA  
\* *C. taeniosporum*, isolated by Krasnikowa in 1968, has been recently described by J.R. Walker  
and co-workers in *Mol. Microb.* **63**, 629–643 (2007) and in *Anaerobe* **14**, 308–324 (2008)

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 Wyd. *Letter Quality*, tel. 22 631 45 18, 607 217 879,  
e-mail: letter.quality@neostrada.pl; projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

Magdalena Kizerwetter-Świda<sup>1</sup>, Marian Binek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedra Nauk Przedklinicznych  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

Wpłynęło w listopadzie 2009 r.

1. Wstęp. 2. Właściwości *Clostridium botulinum*. 2.1. Medyczne zastosowanie toksyny botulinowej. 2.2. *Clostridium botulinum* jako broń biologiczna. 3. Patogeneza i formy choroby. 3.1. Botulizm pokarmowy. 3.2. Botulizm noworodków. 3.3. Botulizm przyranny. 3.4. Przypadki o nieustalonym źródle. 3.5. Botulizm u zwierząt. 4. Diagnostowanie i leczenie. 5. Badania laboratoryjne. 5.1. Zastosowanie metod biologii molekularnej. 6. Występowanie bakterii w naturze, źródła zatrucia. 7. Podsumowanie

### ***Clostridium botulinum* toxicosis – still a serious problem**

**Abstract:** *Clostridium botulinum* is an anaerobic, rod-shaped sporeforming bacterium. The neurotoxins produced by *C. botulinum* are among the most potent toxins known to man. Botulism is a public health emergency. Four distinct forms of botulism may occur, depending on the mode of acquisition of the toxin. The most common form of human botulism is a foodborne disease, with intoxication due to the ingestion of preformed neurotoxin in foods, which is generally related to improperly processed home-made products. Interestingly, there is an increasing number of botulism cases correlated with commercially processed foods. Non-proteolytic strains of *C. botulinum* (group II) are considered hazardous in modern food processing. The most dangerous methods are: mild pasteurization, anaerobic packing and chilled storage. In the United States, the most common form is infant botulism, an infection due to *C. botulinum* spores germination, which produces neurotoxin in the infant's gastrointestinal tract. Recently, wound botulism among injecting drug users has also become a problem.

Prompt diagnosis and early treatment of botulism are essential to minimize the otherwise great risk of death. The initial diagnosis may be difficult in individual cases. Epidemiologic investigation is critical to prevent further cases if hazardous food is still available for consumption. Toxin production is usually detected by a mouse bioassay, which usually takes several days. Recently, alternative rapid methods have been developed for diagnosis of botulism. PCR is a sensitive and specific method for the detection of neurotoxin genes, which allow for the detection of dual-toxin producing strains.

The presented review focuses on the characterization of *Clostridium botulinum*, its occurrence and pathogenicity. Recent changes in epidemiology of human botulism are also discussed.

1. Introduction. 2. Properties of *Clostridium botulinum*. 2.1. Medical application of botulinum toxin. 2.2. *Clostridium botulinum* as biological weapon. 3. Pathogenesis and forms of disease. 3.1. Foodborne botulism. 3.2. Infant botulism. 3.3. Wound botulism. 3.4. Cases of undetermined origin. 4. Diagnosis and treatment. 5. Laboratory examination. 5.1. Application of molecular biology methods. 6. Occurrence of *Clostridium botulinum*, sources of intoxication. 7. Summary

---

**Słowa kluczowe:** botulizm, bezpieczeństwo żywności, *Clostridium botulinum*

**Key words:** botulism, *Clostridium botulinum*, food safety

---

## **1. Wstęp**

Botulizm należy do chorób, do których dochodzi w następstwie spożycia żywności zanieczyszczonej mikroorganizmami produkującymi egzotoksyny. Jest chorobą znaną od dawna, nazwę nadano jej w 1820 roku od łacińskiej nazwy kiełbasy „*botulus*”, związanej historycznie z przyczyną choroby. Sam mikroorganizm, *Clostridium botulinum* został wyizolowany w 1896 roku przez van Ermengema w Belgii. Należy do Gram-dodatnich beztlenowych laseczek szeroko rozpowszechnionych w naturze, przede wszystkim w glebie i osadach dennych zbiorników wodnych [6, 23]. W trakcie wzrostu bakterie wytwarzają biał-

kowe, ciepłowrażliwe toksyny (jad kiełbasiany), różniące się serologicznie, co stało się podstawą do podziału produkujących je szczepów na typy, oznaczone literami A, B, C, D, E, F oraz G. Typy A, B, E oraz w sporadycznych przypadkach typ F powodują botulizm u człowieka, natomiast typy C i D na ogół są odpowiedzialne za botulizm u zwierząt. Szczepy *C. botulinum* typu G oraz niechorobotwórcze gatunki *C. subterminale* oraz *C. hastiforme* zaliczamy obecnie do gatunku *C. argentinense* [38]. Częstość występowania choroby u ludzi jest niewielka, jednakże śmiertelność w wyniku zachorowania jest bardzo wysoka, jeżeli nie podejmie się natychmiastowego i właściwego leczenia [6, 23, 31].

---

\* Autor korespondencyjny: Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, tel.: (+48) 22 593 60 28; e-mail: marian\_binek@sggw.pl

## 2. Właściwości *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* są Gram-dodatnimi bakteriami beztlenowymi, wytwarzającymi przetrwalniki. Cechą fenotypową rozstrzygającą o przynależności do gatunku jest zdolność do wytwarzania neurotoksyny botulinowej (BoNT). W preparatach z hodowli *C. botulinum* ma postać wysmukłych laseczek, z których część wykazuje subterminalne, rzadziej terminalne ułożenie spor. Przypomina to obraz pędu czosnku lub małej łyżeczki. Na podłożu stałym z krwią bakterie tworzą kolonie nieznacznie wypukłe, o nierównym brzegu, niekiedy płaskie i szorstkie, zazwyczaj otoczone strefą hemolizy. Zależnie od urzęsienia komórek i intensywności przetrwalnikowania mogą tworzyć na powierzchni pożywki nalot lub struktury przypominające płatki azbestu [7, 21]. Należą do klostridiów sacharolitycznych i proteolitycznych. Fermentują glukozę, niektóre szczepy (typu B, E i F) laktozę, maltozę (40–50% szczepów typu C i D rozkłada maltozę i mannozę). Szczepy typu B, E i F słabo rozkładają fruktozę. Wszystkie typy *C. botulinum* hydrolizują żelatynę i wytwarzają lipazę, na ogół trawią kazeinę oraz za wyjątkiem części szczepów typu C i D, nie wytwarzają lecytynazy i nie produkują indolu [30].

Według taksonomii Bergey'a z 2009 roku rodzaj *Clostridium* należy do typu XIII *Firmicutes*, klasy II *Clostridia*, rzędu I *Clostridiales*, rodziny I *Clostridiaceae* [24]. Współcześnie gatunek *C. botulinum* dzielony jest na do 4 grup (od I do IV) różniących się cechami fenotypowymi i genotypowymi. Do grupy I zaliczane są proteolityczne szczepy typu A, B oraz F. Grupa II skupia nie proteolityczne szczepy typu B, E oraz F. Natomiast do grupy III należą szczepy typu C oraz D. Botulizm u ludzi wywołują na ogół szczepy z grupy I oraz II, natomiast botulizm u zwierząt powodują szczepy z grupy III. Grupa IV obejmuje niechorobotwórcze szczepy serotypu G. Na podstawie wyników badań właściwości fenotypowych oraz genotypowych zmieniono nazwę szczepów zaliczanych do grupy IV oraz innych niechorobotwórczych gatunków

*Clostridium* na *C. argentinense* [38]. W sporadycznych przypadkach zachorowania u noworodków i osób dorosłych mogą być wywoływane przez gatunki klostridiów inne niż *C. botulinum*, zdolne do wytwarzania toksyny botulinowej, takie jak neurotoksyczne szczepy *C. butyricum* oraz *C. baratii* [6, 23]. Wybrane dane charakteryzujące *C. botulinum* zaliczone do grupy I i II przedstawiono w tabeli I. Klostridia zaliczane do grup I oraz II charakteryzują się różną opornością spor na działanie wysokiej temperatury. Szczepy proteolityczne zaliczane do grupy drugiej są bardziej wrażliwe na działanie wysokiej temperatury i niektóre z nich nie przeżywają ogrzewania w 80°C [6, 9, 22, 30].

Badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej przyczyniły się do lepszego poznania biologii *C. botulinum*. Stwierdzono, że u jednego szczepu mogą występować geny odpowiedzialne za wytwarzanie dwóch toksyn [6, 9, 33]. Zwykle jedna z nich jest produkowana w większych ilościach, natomiast geny kodujące wytwarzanie drugiej toksyny nie ulegają ekspresji lub jest to ekspresja na niskim poziomie. Szczepy takie mogą dawać niespecyficzne wyniki w próbie biologicznej, a ich precyzyjna identyfikacja jest kłopotliwa. Niejednoznaczna odpowiedź, co do przynależności szczepu do serotypu może utrudniać podjęcie decyzji, odnośnie podjęcia leczenia. Wydaje się, że wiele szczepów *C. botulinum* zakwalifikowanych na podstawie wyników testu ochronnego na myszach do typu A lub B może zawierać w swoim materiale genetycznym geny odpowiedzialne za wytwarzanie innych typów toksyn [4, 14–18, 23].

Wytwarzanie dwóch toksyn opisano już w latach 70-tych, szczepy te zaliczono do typu Af, ponieważ w głównej mierze produkowały one toksynę typu A, w mniejszej ilości toksynę typu F [21]. Początkowo izolowano je z próbek gleby w Argentynie, w późniejszych latach potwierdzono ich udział w wywoływaniu zatrucia jadem kiełbasianym u ludzi [6, 14]. Inna grupa izolatów produkujących głównie toksynę A została zaliczona do typu Ab, natomiast u szczepów określanych jako A(B) gen odpowiedzialny za wytwarzanie

Tabela I

Wybrane właściwości *C. botulinum* grupy I i II

Właściwości		Grupa I	Grupa II
Typ neurotoksyny		A, B, F	B, E, F
Botulizm u ludzi		+	+
Temperatura wzrostu °C	minimalna	10	3,3
	optimalna	35–40	18–25
D100 °C spor (min)*		25	< 0,1
D121 °C spor (min)		0,1–0,2	< 0,001
Występowanie		Powszechne, typ A częściej w zachodniej części USA, typ B powszechnie we wschodniej części USA, Europie i Azji	Powszechne, typ E osady morskie na całym świecie

\* – D (dziesięciokrotna redukcja) – czas potrzebny do zabicia 90% bakterii w danej temperaturze

toksyny typu B nie ulega ekspresji. Analiza nieaktywnego genu toksyny B wykazała pewne różnice w jego sekwencji w porównaniu do genu ulegającego ekspresji. Różnice te dotyczą m. in. delecji 6 nukleotydów, którą można wykrywać przy pomocy techniki PCR [17]. Stwierdzono również występowanie szczepów produkujących głównie toksynę typu B i w mniejszych ilościach toksyny A oraz F, które zakwalifikowano do typów Ba oraz Bf [4, 6].

Opisano także przypadki wytwarzania toksyny botulinowej przez *C. butyricum* oraz *C. baratii*. Przypadki botulizmu wywołane przez szczepy *C. butyricum* wytwarzające toksynę botulinową typu E opisano w Indiach, Chinach i we Włoszech. Objawy botulizmu pokarmowego mogą być wywołane przez toksynę typu E produkowaną przez *C. butyricum*. Natomiast botulizm noworodków może być związany z kolonizacją przewodu pokarmowego przez *C. baratii* wytwarzające toksynę typu F [6, 31].

### 2.1. Medyczne zastosowanie toksyny botulinowej

Działanie toksyny botulinowej jest wysoce specyficzne wobec obwodowych zakończeń nerwowych i w pełni odwracalne. Wstrzyknięte miejscowo małe dawki neurotoksyn nie rozprzestrzeniają się poza miejsce podania. Jest to pierwsza biologiczna toksyna dopuszczona do stosowania w leczeniu przez FDA (Food and Drug Administration, Agencja ds. Żywności i Leków). Ma ona zastosowanie w terapii zaburzeń neurologicznych, np.: dystonii krtaniowej, dystonii karku oraz kończyn, kurczu powiek, kurczach dłoni, nadmiernej potliwości, nadmiernemu ślinieniu się, migrenowych bólach głowy oraz w leczeniu zęza [12, 39].

Toksyny botulinowe mają również zastosowanie kosmetyczne. Na rynku dostępne są preparaty zawierające toksynę A oraz B. Częściej stosowana jest toksyna typu A, ponieważ jej działanie utrzymuje się dwa razy dłużej niż toksyny B [12, 39].

### 2.2. *Clostridium botulinum* jako broń biologiczna

CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorób) zalicza *C. botulinum* do drobnoustrojów z grupy A, czyli najbardziej niebezpiecznych, które można zastosować jako broń biologiczna. Najbardziej skuteczną drogą ataku w przypadku tych bakterii jest droga aerozolowa, możliwe jest też zastosowanie celowo skażonej żywności. Badania nad zastosowaniem *C. botulinum* jako broni biologicznej prowadzono w okresie II Wojny Światowej w Japonii, Związku Radzieckim i USA [27]. Po wojnie w Zatoce Perskiej w 1991 roku in-

spektorzy ONZ w Iraku stwierdzili obecność toksyny botulinowej w pociskach raketowych o zasięgu 600 km oraz w bombach. Podobne badania prawdopodobnie nadal trwają w Iranie, Iraku, Korei Północnej oraz Syrii. Do tej pory nie notowano użycia *C. botulinum* jako broni biologicznej podczas wojen. Pod koniec XX wieku japońska sekta Najwyższa Prawda kilkakrotnie podejmowała próby rozpylenia toksyny w centrum Tokio. Próby nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, przyczyną czego mogły być kłopoty z otrzymaniem aerozolu toksyny [27, 37].

### 3. Patogeneza i formy choroby

Toksyna botulinowa jest jedną z najsilniejszych znanych toksyn bakteryjnych, do wywołania choroby u ludzi wystarczy zaledwie kilka nanogramów toksyny, która absorbowana jest do krwioobiegu skąd trafia do nerwów obwodowych. Oddziałuje na zwoje ruchowe rdzenia przedłużonego oraz synapsy nerwów obwodowych i płytki nerwowo-mięśniowe mięśni szkieletowych poprzez hamowanie uwalniania acetylocholino w zakończeniach nerwów ruchowych, co prowadzi do porażenia wiotkiego. Porażenie nerwu przeponowego prowadzi zwykle do śmierci. Związana toksyna nie jest usuwana po podaniu antytoksyny. Stopniowo, po około trzech miesiącach dochodzi do wytworzenia się nowych zakończeń nerwowo-mięśniowych w obrębie płytki ruchowej i do powrotu funkcji przekazywania impulsów nerwowo-mięśniowych. Toksyny botulinowe uszkadzają również komórki innych narządów i naczyń krwionośnych [6, 34].

Poszczególne toksyny botulinowe różnią się budową antygenową, jednak wykazują identyczne działanie. Są one syntetyzowane jako pojedynczy łańcuch nieaktywnego białka o masie cząsteczkowej około 150 kDa, które podlega potranslacyjnej proteolizie do aktywnej formy dwułańcuchowej (50 i 100 kDa), połączonej mostkiem dwusiarczkowym. Toksyny składają się z trzech funkcjonalnych domen, odpowiedzialnych za wiązanie z receptorem, translatację oraz aktywność katalityczną. Toksyny botulinowe gromadzone są w cytozolu komórek bakteryjnych, a po lizie komórek są uwalniane w formie kompleksów określanych jako protoksyny. W skład tych kompleksów wchodzi nietoksyczne białko, tzw. białko NAPs (neurotoxin-associated proteins), których liczba jest różna u poszczególnych typów toksyn botulinowych. Znane są trzy formy protoksyn *C. botulinum*: LL-toksyna (extra large toxin, 900 kDa), L-toksyna (large toxin, 500 kDa) oraz M-toksyna (medium toxin 300 kDa). W cząsteczkach neurotoksyn botulinowych wyróżnia się trzy funkcjonalnie różne domeny: N-końcową domenę o aktywności endopeptydazy zależnej od cynku

(łańcuch lekki L), domenę warunkującą transport toksyny przez błonę ( $H_N$ ) oraz domenę odpowiedzialną za wiązanie toksyny do receptora [34, 36].

Toksyna botulinowa rozprzestrzenia się w ustroju i wiąże z receptorami błony presynaptycznej  $\alpha$ -motoneuronów. Łańcuch lekki ma aktywność specyficznej proteazy, która rozpoznaje i tnie jedynie trzy białka odpowiedzialne za fuzję pęcherzyka synaptycznego zawierającego neuromediator, z błoną neuronu. W ten sposób dochodzi do uszkodzenia białek pęcherzyków presynaptycznych zawierających acetylocholinę. Uniemżliwia to wiązanie pęcherzyka presynaptycznego z błoną presynaptyczną i blokowane jest uwalnianie acetylocholino do przestrzeni synaptycznej. Dochodzi do zmniejszenia potencjału na płycie ruchowej nerwowo-mięśniowej i w efekcie do porażenia wiotkiego mięśni [34, 36].

Współcześnie znane są cztery formy choroby: botulizm pokarmowy, botulizm noworodków, botulizm przyranny oraz tzw. przypadki o nieustalonym źródle. Forma choroby jest związana ze sposobem przedostania się do organizmu żywności zawierającej toksynę botulinową lub spor *C. botulinum*. Botulizm najczęściej przebiega jako intoksykacja, ponieważ same komórki bakteryjne są mało inwazyjne. Rzadziej występuje jako toksykoinfekcja, choć w ostatnich latach notuje się coraz więcej takich przypadków przebiegających w formie botulizmu noworodków lub botulizmu przyrannego.

### 3.1. Botulizm pokarmowy

Botulizm pokarmowy (intoksykacja pokarmowa) powstaje w następstwie spożycia żywności zawierającej toksynę wyprodukowaną przez *C. botulinum*. Żywność zanieczyszczona sporami *C. botulinum* poddana nieodpowiedniej obróbce w warunkach domowych staje się źródłem choroby. Objawy zatrucia pojawiają się zwykle po 12–36 godzinach, chociaż mogą wystąpić już po 4 godzinach lub nawet po 8 dniach. Dochodzi do ostrej obustronnej neuropatii nerwu czaszkowego, czego konsekwencją jest suchość w ustach oraz utrudnione połykanie, niewyraźna mowa, opadanie powiek, porażenie mięśni oka. Wczesne objawy choroby manifestują się osłabieniem i zawrotami głowy, pojawieniem się podwójnego widzenia, trudnościami w mówieniu i połykaniu. Pacjent nie gorączkuje i zachowuje przytomność, chociaż może popadać w letarg i mieć trudności w komunikowaniu się. Nie dochodzi do zmian czucia. W łagodnej formie choroby nie rozwijają się inne objawy i pacjent może nawet nie zgłosić się do lekarza. Postęp choroby manifestuje się zstępującą symetrycznie słabością mięśni, co prowadzi do utraty kontroli nad utrzymaniem głowy, hypotonii, ogólnego osłabienia, wzdęcia brzucha,

trudnościami w oddychaniu a nawet jego zaprzestania. W trakcie postępu choroby odruchy ścięgnowe ulegają osłabieniu i może dochodzić do zaporcia [23].

W przypadku nie podjęcia leczenia dochodzi do porażenia mięśni oddechowych, a śmierć następuje w wyniku niedrożności oddechowej lub zaprzestania funkcji oddechowej. Objawy chorobowe są zróżnicowane w zależności od dawki toksyny. Pacjenci z ciężkimi i ostrymi objawami zatrucia wymagają długiej opieki lekarskiej. Wspomaganie oddychania jest konieczne przez 2 do 8 tygodni, w ciężkich przypadkach nawet przez 7 miesięcy. Poprawa stanu pacjenta wymaga wytworzenia się nowych połączeń nerwowo-mięśniowych [6, 23, 33].

### 3.2. Botulizm noworodków

Botulizm noworodków opisany po raz pierwszy w 1976 roku, dotyczy dzieci poniżej 12 miesiąca życia. Do choroby dochodzi w następstwie spożycia wraz z żywnością spor *C. botulinum*, które podlegają następnie germinacji. Ten typ botulizmu jest zwykle związany ze spożyciem miodu lub mleka w proszku dla niemowląt zanieczyszczonych sporami. Bakterie kolonizują jelita, namnażają się oraz wytwarzają toksynę. Co ciekawe, notowano przypadki, kiedy pozostali dorośli członkowie rodzin, którzy spożywali ten sam miód nie chorowali. Źródłem spor *C. botulinum* dla niemowląt może być także syrop kukurydziany lub kurz z odkurzacza [6].

Przebieg choroby może być łagodny, odchodzi do zaporcia i porażenia nerwów czaszkowych, a następnie nerwów obwodowych. Trudności w przyjmowaniu pokarmu powodują niedożywienie i osłabienie oraz popadanie w letarg. Charakterystyczne jest zbieranie się wydzieliny w jamie ustnej oraz amiotonia. W ciężkim przebiegu choroby występuje porażenie mięśni oddechowych, prowadzące do śmierci. Botulizm noworodków jest obecnie najczęściej notowany w Stanach Zjednoczonych [6, 33].

### 3.3. Botulizm przyranny

Botulizm przyranny zdarza się najrzadziej, chociaż w Wielkiej Brytanii w ostatnich latach jest to najczęstsza forma choroby. Do choroby dochodzi po przedostaniu się do rany spor *C. botulinum*, często razem z innymi bakteriami oraz produkcji toksyny, która przenika do krwiobiegu i wraz z krwią do innych części organizmu. Często są to powypadkowe rany głębokie. Objawy neurologiczne są takie same jak w przypadku botulizmu pokarmowego, nie występują jedynie symptomy ze strony przewodu pokarmowego. Ostatnio coraz powszechniej notowany jest botulizm przyranny u osób stosujących narkotyki [6, 33].

### 3.4. Przypadki o niestalonym źródle

W niektórych przypadkach botulizmu, mimo dokładnego badania i wywiadu nie udaje się zidentyfikować źródła bakterii lub toksyn w żywności. Przypadki takie są określane przez CDC jako przypadki o „niestalonym źródle” (undetermined origin). Występują one u osób dorosłych i dzieci powyżej 12 miesiąca życia, są odpowiednikami botulizmu niemowląt. Zwykle zdarza się to u pacjentów, u których wykonywano operacje przewodu pokarmowego lub leczonych antybiotykami. Wspomniane zabiegi prawdopodobnie mogą wpływać na zakłócenie naturalnej równowagi w mikroflorze jelitowej, co doprowadza do kolonizowania *C. botulinum* [5, 26].

### 3.5. Botulizm u zwierząt

Botulizm u zwierząt najczęściej wywołują szczepy *C. botulinum* typu C oraz D, rzadziej A, B oraz E. Na przebieg objawów klinicznych ma wpływ ilość przyjętej toksyny oraz gatunkowa wrażliwość zwierząt. Najbardziej wrażliwe są ssaki nieparzystokopytne, następnie ptaki (zwłaszcza kaczki i kury), duże i małe przeżuwacze. Psy i trzoda chlewna są raczej odporne. Znaczą odporność wykazują zwierzęta mięsożerne (głównie lisy) oraz wolno żyjące gryzonie. Natomiast wyjątkowo wrażliwe spośród zwierząt mięsożernych są norki. Zwierzęta laboratoryjne są wrażliwe na wszystkie typy neurotoksyn [22, 23].

Zatrucie jadem kiełbasiany u zwierząt może występować na całym świecie, choć jest spotykane rzadko. Predysponowane do występowania objawów klinicznych są szczególnie bydło i owce hodowane na terenach ubogich w fosfor oraz białko w Afryce i Australii. W przypadku zwierząt hodowlanych botulizm może przebiegać w formie epidemii. Chore osobniki wydają do środowiska przetrwalniki, które zanieczyszczają paszę i wodę. Objawy występują najczęściej po spożyciu paszy zawierającej toksyny lub wskutek toksykoinfekcji, gdy dochodzi do rozwoju przetrwalników i produkcji toksyn w jelitach lub w miejscu zranienia [22].

Spśród różnych gatunków zwierząt, stosunkowo często choroba jest obserwowana u bydła po spożyciu nieodpowiednio przygotowanej kiszonki lub sianokiszonki. Materiał roślinny może być zanieczyszczony sporami *C. botulinum*, zwłaszcza w przypadkach stosowania nawożenia odchodami kurzymi. Laseczki należące do typu D na ogół nie powodują botulizmu u kur, natomiast są w dużych ilościach wydalane z kałomoczem, dlatego nawożenie pól odchodami kurzymi jest czynnikiem sprzyjającym botulizmowi bydła. Spory mogą także pochodzić ze zwłok drobnych gryzoni, które przypadkowo dostają się do materiału na

kiszonkę. Przy nieodpowiednim przebiegu procesu zakiszenia paszy w wewnętrznych jej partiach dochodzi do wytworzenia się warunków beztlenowych sprzyjających rozwojowi *C. botulinum* oraz produkcji toksyn. Na zatrucie narażone są również zwierzęta hodowane na terenach niedoborowych w fosfor, bydło stara się wtedy uzupełnić niedobory przez spożywanie kości padłych zwierząt zawierających nagromadzone neurotoksyny [22, 23].

Botulizm u ptaków jest wywoływany głównie przez *C. botulinum* typu C, rzadziej A, B lub E. Najczęściej występuje on na terenach podmokłych, sezonowo zalanych. Chorują w głównej mierze wolnożyjące ptaki wodne, zaś z ptaków udomowionych kaczki, bażanty oraz kury. Wiosną na terenach podmokłych dochodzi do gnicia materiału roślinnego, powstają warunki beztlenowe, korzystne do rozwoju *C. botulinum*. Do rozprzestrzeniania się choroby przyczyniają się również larwy owadów, którymi odżywiają się ptaki. Larwy owadów są niewrażliwe na działanie toksyny typu C, natomiast mogą gromadzić w swoich organizmach zarówno toksynę, jak i spory.

Konie są bardzo wrażliwe na działanie jadu kiełbasianego. Zatrucie występuje u nich z reguły po spożyciu zanieczyszczonej toksyną paszy. Szczególna forma toksykoinfekcji występuje u źrebiąt, u których w przewodzie pokarmowym nie wykształciła się naturalna ochronna mikroflora. Mleko kłaczy zawierające wysoki poziom hormonów kortykosteroidowych jest czynnikiem predysponującym do wystąpienia u takich źrebiąt botulizmu.

Do niedawna poważnym problemem były epidemie botulizmu w hodowlach nerek. Obecnie dzięki stosowaniu programów szczepień ochronnych masowe zatrucia toksyną botulinową u tej grupy zwierząt zostały znacznie ograniczone. Przykładem może być masowe zatrucie jadem kiełbasianym u nerek i lisów w Finlandii, w wyniku którego 52 000 zwierząt padło lub zostało poddanych eutanazji [32]. Botulizm u nerek, lisów, niekiedy również trzody chlewnej i psów jest związany z karmieniem zwierząt padliną, drobiowymi odpadkami z rzeźni oraz odpadkami z ryb, które mogą zawierać spory lub toksyny *C. botulinum* [22].

Objawy kliniczne zatrucia jadem kiełbasianym są podobne u wszystkich gatunków zwierząt, występują zwykle po 3 do 17 dniach inkubacji. U bydła można obserwować ostry, podostry lub przewlekły przebieg zatrucia, w zależności od ilości wchłoniętej toksyny. Przy ostrym przebiegu zwierzęta padają w ciągu kilku do kilkunastu godzin, w przebiegu przewlekłym, śmierć może nastąpić nawet po 17 dniach. Początkowo stwierdza się brak apatyty, zaburzenia koordynacji, bezład i porażenia wiotkie. Porażenia w pierwszej kolejności dotyczą mięśni kończyn tylnych i ogona, następnie obejmują kończyny przednie oraz żuchwę

i język. Prowadzi to do charakterystycznej pozycji leżącej z głową skreconą w bok. U ptaków porażenia początkowo obejmują kończyny i skrzydła, następnie mięśnie szyi. Można u nich obserwować opadanie głowy i skręt szyi. Przy zatruciu toksyną typu C u kurcząt brojlerów nie występują porażenia wiotkie, obserwuje się natomiast zapalenie jelit i biegunkę [22, 23].

#### 4. Diagnozowanie i leczenie

Rozpoznanie botulizmu u pacjenta opiera się na podstawie charakterystycznych objawów klinicznych i nie jest łatwe, ponieważ obraz choroby może być zróżnicowany w zależności od jej stadium i dawki toksyny [31]. Szczególnie kłopotliwe jest rozpoznanie pojedynczych przypadków o łagodnym przebiegu. Okres inkubacji choroby wynosi średnio 12–36 godzin. W diagnostyce różnicowej należy uwzględnić zespół Guillain-Barré, *miastenia gravis*, udar, zatrucie spowodowane takimi czynnikami tłumiącymi, jak alkohol metylowy, węglan baru, chlorek metylenu, organiczne związki fosforu, zatrucie grzybami, atropiną, czy CO, a także zapalenie substancji szarej rdzenia, zakażenia w obrębie centralnego układu nerwowego, guz mózgu czy choroby psychiczne. W wywiadzie istotna jest informacja o spożywaniu domowych przetworów. Botulizm w odróżnieniu od innych chorób przebiegających z objawami porażenia wiotkiego wyróżnia się tym, że wyraźne objawy pojawiają się w miejscach unerwianych przez nerwy czaszkowe i są symetryczne. Nie zanikają symptomy czuciowe. W celu odróżnienia od innych chorób przydatne jest badanie w tomografii komputerowej, elektromiografia i badanie płynu mózgowo-rdzeniowego. W tym ostatnim przypadku poszukuje się czynników zakaźnych lub oznacza białko, którego ilość wzrasta np. w chorobie Guillain-Barre a pozostaje w normie przy zatruciu jadem kiełbasianym. Botulizm noworodków jest diagnozowany na podstawie wykrywania toksyny i bakterii w kale. Botulizm noworodków należy różnicować z sepsą, szczególnie meningokokową, encefalopatią oraz wrodzona miopatią [6, 31].

Podstawowym założeniem w leczeniu botulizmu jest inaktywacja toksyny. Efekt ten uzyskuje się poprzez dożylnie podanie antytoksyny, która neutralizuje wolną jeszcze toksynę niezwiązaną z zakończeniami nerwowymi. Decyzja, co do podania antytoksyny powinna być powzięta na podstawie oceny stanu klinicznego pacjenta, historii choroby i nie powinna być odkładana do czasu uzyskania wyników badań laboratoryjnych, ponieważ terapia jest najbardziej skuteczna we wczesnym stadium choroby. Podanie antytoksyny wiąże się z określonym ryzykiem, ponieważ niektórzy pacjenci wykazują nadwrażliwość na obco-

gatunkową surowicę. Antybiotykoterapia nie ma zastosowania do leczenia botulizmu pokarmowego, co więcej podanie leku może przyczynić się do uwalniania toksyny w jelitach. Pacjenci wymagają leczenia wspomagającego, czasami przez wiele miesięcy, w tym odżywiania przy pomocy sondy lub parenteralnego, oddychania przy pomocy respiratora, jak również leczenia wtórnych zakażeń [31, 34].

Objawy występujące przy zatruciu jadem kiełbasianym u ludzi uważane są za wysoce charakterystyczne. Jednak w przypadkach osób starszych ze współistniejącymi innymi schorzeniami rozpoznanie kliniczne może być trudne, ponieważ objawy zatrucia mogą być u nich słabo wyrażone. Chwałuk i Chwałuk [8] opisują dwa przypadki botulizmu o nietypowym przebiegu klinicznym u pacjentów w podeszłym wieku. Autorzy zwracają uwagę, że prawidłowe rozpoznania postawiono z opóźnieniem, mimo zastosowania antytoksyny jeden z pacjentów zmarł.

#### 5. Badania laboratoryjne

Rozpoznanie botulizmu opiera się na obserwacji klinicznej chorego. Badanie laboratoryjne może potwierdzić słuszność diagnozy, ale jej nie wykluczyć. Wykrycie toksyny potwierdza kliniczne rozpoznanie choroby. Toksyny botulinowej poszukuje się we krwi chorego, kale, treści żołądkowej i jelitowej a także żywności, którą chory spożywał. Podejmuje się również próby izolacji *C. botulinum* z kału raz treści żołądka i jelit. Bakterii powinno się również poszukiwać w podejrzanej o spowodowanie zatrucia żywności, tym niemniej ze względu na powszechne występowanie spor *Clostridium* w środowisku ich obecność może nie mieć związku z chorobą [6, 29]. Izolacja i identyfikacja bakterii zajmuje kilka tygodni. Właściwości biochemiczne *C. botulinum* nie zawsze pozwalają na pewną identyfikację gatunku. Badania Lindström i wsp. [28] oraz Brett [7] wykazały, że szczepy *C. botulinum* mogą być nieprawidłowo zidentyfikowane przy pomocy testów API 20A, Rapid ID 32A oraz Rapid ANAII. Dotyczy to szczególnie szczepów proteolitycznych z grupy I, które mogą wykazywać cechy podobne do *C. sporogenes* [7].

Ograniczeniem dla badań laboratoryjnych jest w niektórych przypadkach niemożność pobrania odpowiednich próbek materiałów klinicznych – koncentracja toksyny może być poniżej progu jej wykrywalności lub także ulec degradacji podczas transportowania próbek. Szacuje się, że w około 30–40% zatruc, koncentracja toksyny w pobranych próbkach jest poniżej progu wykrywalności. Ważny jest również przedział czasu, w którym można ją wykryć w materiałach klinicznych pobranych od chorego i tak np. u >50% cho-



rych stwierdza się jej obecność w surowicy i kale w ciągu 1 dnia od zatrucia i tylko u <25% chorych po 3 dniach. *C. botulinum* stwierdza się u >70% chorych w przeciągu 2 dni i tylko u 40% po 10 dniach. Materiał od chorego do badania na obecność toksyny należy pobrać przed podaniem antytoksyny [6].

Klasyczne metody wykrywania toksyny botulinowej przy pomocy próby biologicznej wykonywane są na wrażliwych zwierzętach laboratoryjnych, najczęściej na myszach, świnkach morskich lub innych drobnych ssakach. Wymagają one jednak długiego czasu obserwacji zwierząt (do 4 dni), co utrudnia szybkie podjęcie ukierunkowanego leczenia. Test ochronny na myszach może dawać niespecyficzne wyniki w przypadku botulizmu wywołanego przez szczepy *C. botulinum* wytwarzającego dwa typy neurotoksyn. Objawy zatrucia jadem kiełbasianym mogą być związane z obecnością w badanym materiale toksyn typu E lub F. W takich przypadkach należy brać pod uwagę możliwość wytwarzania neurotoksyn przez *C. butyricum* oraz *C. baratii*, a ostateczne rozpoznanie czynnika etiologicznego powinno być poparte metodami hodowlanymi. Badanie w próbie biologicznej próbek kału lub gleby może wywołać niespecyficzne upadki zwierząt. Ponadto toksyny typu C i D dają w teście ochronnym reakcje krzyżowe. Metody biologiczne służą jako testy referencyjne oraz umożliwiają określanie aktywności biologicznej badanych toksyn lub antytoksyn [23, 31].

Szybka diagnostyka w przypadku zatrucia jadem kiełbasianym ma decydujące znaczenie dla natychmiastowego podania choremu typowo swoistej surowicy antytoksycznej. W ostatnim czasie coraz częściej do laboratoryjnego potwierdzania botulizmu stosuje się metody biologii molekularnej takie jak PCR, multiplex PCR, czy PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) [10, 13, 15, 23]. Skrócenie czasu diagnozy do kilku godzin umożliwia także odczyn immunoenzymatyczny (ELISA), odczyn hemaglutynacji pośredniej (HAp) lub odczyn immunofluorescencyjno-adsorpcyjny (IFOA). Charakteryzują się one wysoką czułością i swoistością, prostotą wykonania i interpretacji wyników, czas oczekiwania na wynik wynosi kilka godzin. Najczęściej stosowane są testy ELISA, których czułość w porównaniu do próby biologicznej jest 10 do 100 razy mniejsza [6, 28].

### 5.1. Zastosowanie metod biologii molekularnej

Próba biologiczna na zwierzętach laboratoryjnych pozostaje referencyjną metodą wykrywania toksyn botulinowych. Konwencjonalne metody wykrywania i identyfikacji *C. botulinum* coraz częściej są zastępowane przez metody biologii molekularnej oparte na analizie DNA. Najczęściej stosowana jest reakcja łań-

cuchowej polimerazy lub hybrydyzacja DNA. Niewątpliwą zaletą tych metod jest czułość i specyficzność oraz możliwość szybkiego uzyskania wyników, w porównaniu z próbą biologiczną lub metodami hodowlanymi [16, 31].

W diagnostyce botulizmu przy pomocy technik biologii molekularnej wykrywane są specyficzne fragmenty genów odpowiedzialne za wytwarzanie neurotoksyn. Natomiast nie bada się aktywności neurotoksyn w badanych próbkach, co w niektórych przypadkach może stanowić wadę stosowania tych metod. Metody biologii molekularnej są bardzo skuteczne w badaniu przesiewowym kolonii bakteryjnych lub próbek podanych przednamnażaniu na podłożach płynnych. W większości metod opartych na reakcji PCR wykrywa się obecność fragmentu jednego z siedmiu genów kodujących neurotoksyny. Opracowano także metodę multiplex PCR pozwalającą na wykrywanie w jednej reakcji aż czterech toksyn: A, B, E oraz F, co skraca czas oczekiwania na wynik oraz obniża koszty odczynników [16, 31].

Liczba komórek lub spor *C. botulinum* w badanych próbkach może być bardzo niska, co może nawet uniemożliwić uzyskanie pozytywnego wyniku amplifikacji DNA. Dla podwyższenia czułości reakcji PCR stosowany jest często etap przednamnażania umożliwiający germinację spor i zwiększenie liczby komórek *C. botulinum* w badanej próbce. Ustalając temperaturę przednamnażania należy pamiętać, że optymalna temperatura inkubacji dla szczepów *C. botulinum* z grupy I wynosi od 35 do 37°C, natomiast dla grupy II od 26 do 30°C. Możliwe jest zastosowanie w procesie przednamnażania dwóch różnych temperatur. Czas przednamnażania powinien być optymalizowany dla poszczególnych rodzajów próbek oraz stosowanego podłoża. Zbyt krótki czas przednamnażania może powodować nadmierne namnożenie innych bakterii zanieczyszczających próbkę. Z kolei zbyt długa inkubacja może powodować lizę komórek *C. botulinum* lub sporulację. Optymalne wydaje się zastosowanie reakcji PCR w ciągu kilku kolejnych dni przednamnażania [30].

Czułość wykrywania *C. botulinum* w reakcji PCR oraz hybrydyzacji DNA w próbkach takich jak kał, krew i próbki żywności może być znacznie obniżona. Niektóre substancje obecne w tego rodzaju próbkach, takie jak: sole kwasów żółciowych, immunoglobuliny, krew oraz białko i tłuszcz obecne w żywności, mogą hamować przebieg reakcji amplifikacji DNA lub znacząco zmniejszać jej czułość. Większa czułość jest osiągana przy stosowaniu jako matrycy DNA wyizolowanego z wyhodowanych kolonii bakteryjnych. Także technika nested-PCR cechuje się większą czułością oraz umożliwia ona skrócenie lub całkowitą eliminację etapu przednamnażania, często stosowanego w konwencjonalnej reakcji PCR [30].

## 6. Występowanie bakterii w naturze, źródła zatrucia

Jak już wspomniano *C. botulinum* i jego forma przetrwalna są rozpowszechnione w naturze. Występują w ziemi uprawnej i leśnej, w osadach i mułach strumieni wodnych, rzek, jezior, w przybrzeżnych wodach mórz i oceanów. Są obecne w przewodzie pokarmowym krabów, mięczaków, ryb oraz ssaków. Praktycznie każda żywność może być zanieczyszczona laseczkami *C. botulinum* i jeżeli nie zostanie poddana zabiegom, w trakcie których spory tych bakterii giną, wówczas w trakcie jej przechowywania, w sprzyjających warunkach temperaturowych (patrz tabela I, klostridia z II-giej grupy zdolne są do namnażania się w temperaturze lodówki) i pH powyżej 4,6 może dochodzić do germinacji spor, namnażania się bakterii i produkcji toksyny. Jeżeli taka żywność przed spożyciem nie zostanie poddana obróbce cieplnej inaktywującej jad kiełbasiany (minimum: ogrzewanie w temperaturze 80°C przez 10 minut, a najlepiej gotowanie przez 20 minut), wówczas dochodzi do botulizmu. Toksyna botulinowa była wykrywana w wielu różnych produktach żywnościowych, jak np.: puszkowanej kukurydzy, papryce, zielonej fasoli, różnego typu zupach, miodzie, pieczarkach, dojrzałych oliwkach, szpinaku, rybach, mięsie i przetworach drobiowych, konserwach mięsnych, szynce, kiełbasie, faszerowanych jajach, homarach, wędzonych i solonych rybach [1, 6, 30].

Występowanie botulizmu w poszczególnych krajach na świecie jest zróżnicowane, ale ogólnie niskie w porównaniu do innych intoksykacji i toksykoinfekcji pokarmowych. Na częstość zatruc mają wpływ regionalne przyzwyczajenia żywieniowe, dostępność żywności, co powoduje, że nie jest ona przetwarzana i przechowywana w warunkach domowych, przemysłowe przetwarzanie żywności i nadzór nad jej pozyskiwaniem, przetwarzaniem i dystrybucją [1]. Wspólny rynek krajów EU powoduje, że następuje wolny przepływ żywności pomiędzy krajami członkowskimi. Żywność importowana do krajów EU musi odpowiadać wymaganiom jakościowym i prawnym ustanowionym przez kraje Wspólnoty Europejskiej. To powoduje, że do zatruc produktami przetworzonymi w sposób przemysłowy dochodzi stosunkowo rzadko, częściej natomiast produktami przetwarzanymi i przechowywanymi w warunkach domowych. W Europie źródłem zatruc jadem kiełbasianym są głównie przetwory domowe zawierające mięso, natomiast w Stanach Zjednoczonych przetwory domowe przygotowane z produktów pochodzenia roślinnego zanieczyszczonych przetrwalnikami *C. botulinum*. Przetwory domowej produkcji przygotowywane w niewłaściwy sposób znacznie częściej są źródłem *C. botulinum*, niż żywność produkowana na masową skalę. W technologii produkcji konserw jednym z krytycznych punktów jest

inaktywacja spor *C. botulinum* przez ogrzewanie w wysokiej temperaturze. W warunkach domowych nie zawsze jest osiągnięta odpowiednia temperatura lub ogrzewanie jest zbyt krótkie. W takich przypadkach laseczki jadu kiełbasianego mogą być obecne w przetworach i wytworzyć toksynę. Aby zmniejszyć prawdopodobieństwo zatrucia należy przetwory domowe ogrzewać bezpośrednio przed spożyciem [1, 6, 30].

W ostatnich latach notowane są również przypadki botulizmu związanego ze spożyciem żywności produkowanej przemysłowo (Tab. II). Jak już wspomniano wcześniej, szczepy *C. botulinum* zaliczane do grupy I i II różnią się właściwościami fizjologicznymi (Tab. I). Przypadki botulizmu odnotowane w wyniku spożycia żywności produkowanej przemysłowo spowodowane są nieproteolitycznymi szczepami zaliczanymi do II grupy, zdolnymi do namnażania się w temperaturze około 3°C. Wzrost liczby przypadków zatruc jadem kiełbasianym po spożyciu żywności produkowanej przemysłowo jest spowodowany pewnymi zmianami w metodach produkcji żywności [35]. Przez konsumentów pożądanym jest, aby produkty żywnościowe były przetworzone oraz poddane działaniu środków konserwujących w jak najmniejszym stopniu. Z tego powodu często procesy technologiczne ograniczają się jedynie do schłodzenia produktu i pakowania w atmosferze dwutlenku węgla. Chłodziarki na etapie dystrybucji żywności oraz w domach konsumentów często zapewniają jedynie temperaturę 10°C, w której spory *C. botulinum* z grupy II mogą ulegać germinacji. Ponadto pakowanie produktów spożywczych w atmosferze dwutlenku węgla sprzyja przeżywaniu laseczek jadu kiełbasianego. Innym czynnikiem umożliwiającym przeżywanie *C. botulinum* procesu przetwarzania żywności jest ogrzewanie produktów w niższych zakresach temperatur, które nie działają bójkowo na spory tych bakterii. Stosowanie niskich temperatur wynika z preferencji konsumentów do minimalizowania zmiany cech organoleptycznych, co dzieje się w wyniku oddziaływania wysokiej temperatury. Nie ma ustalonych wytycznych dotyczących czasu i temperatur ogrzewania produktów żywnościowych o niskim stopniu przetworzenia, które zapewniłyby zniszczenie spor *C. botulinum*. Ciepłooporność spor zależy bowiem od składu poszczególnych produktów. Z tego powodu opracowanie uniwersalnych norm jest nie możliwe. Zalecaną metodą zapobiegającą namnażaniu się *C. botulinum* w żywności produkowanej przemysłowo jest zapewnienie podczas produkcji i dystrybucji temperatury poniżej 3°C [1, 30, 35].

W Polsce przypadki zatrucia jadem kiełbasianym u ludzi odnotowywane są od 1952 roku. Częstość występowania botulizmu w latach 60-tych i 70-tych była wysoka. Podobnie bardzo wysoka częstość występowania botulizmu miała miejsce w okresie przeobrażeń

Tabela II

Przypadki botulizmu związanego ze spożyciem żywności produkowanej przemysłowo, wywołane przez szczepy *C. botulinum* z grupy II

Rok	Kraj	Liczba przypadków (liczba zgonów)	Rodzaj żywności (Typ <i>C. botulinum</i> )	Piśmiennictwo
1980–2002	Gruzja	85	Ryba wędzona (E)	[31]
1990	USA	3	Jesiotr (NB)	[31]
1991	Egipt	91	Solony kielb, niewytrzewiony (E)	[40]
1992	USA	3	Solona ryba, niewytrzewiana (E)	[31]
1996	Włochy	8 (1)	Ser mescarpone (A)	[3]
1997	Hiszpania	3	Szparagi w puszcze (B)	
1997	Niemcy	2	Ryba wędzona (E)	[26]
1997–2003	Norwegia	9	Fermentowana ryba („rakfish”, E)	[31]
1998	Japonia	6	Solone oliwki (B)	[31]
1999	Maroko	78 (20)	Mortadela (B)	[31]
1999	Rosja	72	Ryba (NB)	[31]
2002	RPA	2 (2)	Sardynki z puszki (A)	[19]
2003	Francja	4	Koszerne kielbaski wołowe i drobiowe (B)	[31]
2004	Rosja	10 (1)	Ryba wędzona (NB)	[31]
2004	Rosja	4 (1)	Ryba suszona (NB)	[31]
2004	Ukraina	6	Ryba suszona (NB)	[31]
2009	Francja	3	Ryba wędzona (E)	[25]

(NB) – nie badano

społecznych i braku żywności w latach 80-tych. Dla przykładu w 1964 roku odnotowano 201 przypadków botulizmu (współczynnik zapadalności 0,6 na 100 000 osób), a w roku 1982 odnotowano 738 zachorowań (współczynnik zapadalności 2 na 100 000 osób). W latach 1988–1998 odnotowano około 2000 przypadków zachorowań na botulizm, i była to znacznie większa liczba w porównaniu do innych krajów europejskich, jak np.: Włochy (412 przypadków), Niemcy (177 przypadków), Hiszpania (92 przypadki). Od 1991 roku obserwuje się tendencję spadkową występowania botulizmu w Polsce, która utrzymuje się do czasów obecnych, w 2004 roku odnotowano 53 przypadki choroby a w 2005 roku 46 przypadków (współczynnik zapadalności 0,12 na 100 000 osób), co prawdopodobnie wynika z lepszego zaopatrzenia rynku w żywność i podniesienia standardów życia [6, 23, 34].

Dobra sytuacja epidemiologiczna nie powinna jednak usypiać czujności w kontrolowaniu tej choroby, ponieważ zmieniające się zwyczaje żywieniowe polegające na spożywaniu pokarmów minimalnie przetworzonych a więc potencjalnie zanieczyszczonych sporam *C. botulinum*, mogą doprowadzać do pojawienia się większej liczby zatruc.

Nowym zjawiskiem w epidemiologii botulizmu jest wzrost przypadków botulizmu przyrannego u osób stosujących narkotyki [11]. Najwięcej przypadków jest związanych z domięśniowymi lub podskórnymi wstrzyknięciami heroiny. Możliwe jest również wystąpienie objawów botulizmu po wdychaniu heroiny.

Osoby przyjmujące narkotyki drogą wziewną mają często uszkodzoną bonę śluzową nosa lub zatok przynosowych, przez którą bakterie mogą łatwo wnikać do organizmu. Do zanieczyszczenia heroiny przez *C. botulinum* może dochodzić na każdym etapie produkcji. Heroina jest słabo rozpuszczalna w wodzie, dlatego przed wstrzyknięciem rozpuszcza się ją w słabym roztworze kwasu cytrynowego i ogrzewa. Ogrzewanie stymuluje wytwarzanie spor, jednocześnie zabija większość innych bakterii zanieczyszczających heroinę, mogących „konkurować” z *C. botulinum* w wywołaniu infekcji. Wielokrotnie powtarzane iniekcje domięśniowe powodują uszkodzenie i bliznowacenia tkanki mięśniowej oraz miejscowe zmniejszenie przepływu krwi. W takiej sytuacji dochodzi do tworzenia ropni, w których panują warunki beztlenowe, sprzyjające rozwojowi *C. botulinum* [2, 5, 11, 20].

Najwięcej przypadków botulizmu u osób wstrzykujących sobie narkotyki stwierdza się w Stanach Zjednoczonych, w 2000 roku było to 90% przypadków odnotowanych w całym świecie. Podobne zjawisko występuje także w Europie: w takich krajach jak Anglia, Irlandia, Szwajcaria oraz Norwegia, w których stwierdza się coraz większą liczbę przypadków botulizmu przyrannego u osób stosujących narkotyki. W Stanach Zjednoczonych notuje się rocznie około 110 przypadków botulizmu przyrannego, co stanowi około 30–40% wszystkich zatruc jadem kielbasianym. W Anglii i Irlandii w latach 2000–2001 rozpoznano 10 przypadków botulizmu przyrannego, w roku 2002

– 23 przypadki, w 2003 – 15 przypadków oraz w roku 2004 – 40 przypadków. W Niemczech w roku 2006 potwierdzono laboratoryjnie botulizm przyranny u 4 pacjentów [2, 5, 20].

## 7. Podsumowanie

Zauważalne zmiany w epidemiologii botulizmu u ludzi pozwalają przypuszczać, że w najbliższych latach można spodziewać się wzrostu liczby przypadków zatruc jadem kiełbasianym po spożyciu żywności produkowanej przemysłowo oraz w grupie ludzi stosujących narkotyki. Nie można wykluczyć także zatruc wywołanych przetworami domowymi. Szczególnie łatwy obecnie przepływ towarów i ludzi, może przyczynić się do wystąpienia zatruc nietypowym dla danego terenu produktem żywnościowym lub typem *C. botulinum*. Szczególną uwagę należy zwrócić na bezpieczeństwo konsumentów żywności niskoprzetworzonej, która może być źródłem szczepów *C. botulinum* należących do grupy II.

Kliniczne przypadki botulizmu występują stosunkowo rzadko, co może dodatkowo utrudniać prawidłowe rozpoznanie i opóźnić decyzję co do podjęcia leczenia. Niektóre kraje, jak np.: Francja nie produkują już antytoksyny botulinowej, ze względu na wysokie koszty produkcji. Biorąc pod uwagę zagrożenie dla życia ludzi, ostatnio słyszy się propozycje utworzenia działającego na wzór CDC w Stanach Zjednoczonych, w całej Europie ośrodka do spraw rozpoznawania i leczenia botulizmu.

## Piśmiennictwo

- Abgueuen P., Delbos V., Chennebault J.M., Fanello S., Brenet O., Alquier P., Granry J.C., Pichard E.: Nine cases of foodborne botulism type B in France and literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 749–752 (2003)
- Akbulut D., L. de Souza-Thomas i wsp.: Wound botulism in injectors of drugs: upsurge in cases in England during 2004. *Euro. Surveill.* **10**, 172–174 (2005) (praca jest dziełem 11 autorów)
- Aureli P., Franciosa G., Pourshaban M.: Foodborne botulism in Italy. *Lancet*, **348**, 1594 (1996)
- Barash J.R., Arnon S.S.: Dual toxin-producing strain of *Clostridium botulinum* type Bf isolated from a California patient with infant botulism. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1713–1715 (2004)
- Barry J., Ward M., Cotter S., Macdiarmada J., Hannan M., Sweeney B., Grant K.A., McKeown P.: Botulism in injecting drug users, Dublin, Ireland, November–December 2008. *Euro. Surveill.* **14**, 1–3 (2009)
- Botulism in the United States, 1899–1996. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases Division of Bacterial and Mycotic Diseases (1998)
- Brett M.M.: Evaluation of the use of the bioMerieux Rapid ID32 for the identification of *Clostridium botulinum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 81–84 (1998)
- Chwałuk P., Chwałuk A.: Trudności diagnostyczne w zatruciu jadem kiełbasianym – opis przypadków i przegląd piśmiennictwa. *Przegl. Lek.* **64**, 348–351 (2007)
- Collins M.D., East A.K.: Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 5–17 (1998)
- Dahlenborg M., Borch E., Rådström P.: Development of combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* types B, E and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4781–4788 (2001)
- Davis L.E., King M.K.: Wound botulism from heroin skin popping. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **8**, 462–468 (2008)
- Fabrizi A., Travaglione S., Falzano L., Fiorentini C.: Bacterial protein toxins: current and potential clinical use. *Curr. Med. Chem.* **15**, 1116–1125 (2008)
- Fach P., Gibert M., Griffais R., Popoff M.R.: Investigation of animal botulism outbreaks by PCR and standards methods. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 279–285 (1996)
- Fernández R.A., Ciccarelli A.S., Arenas G.N., Giménez D.F.: First outbreak of botulism caused by *Clostridium botulinum* subtype Af. *Rev. Argent. Microbiol.* **18**, 29–31 (1986)
- Franciosa F., Ferreira J.L., Hatheway C.L.: Detection of type A, B, and E botulism neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms. *J. Clin. Microb.* **32**, 1911–1917 (1994)
- Franciosa F., Florodi F., Maugliani A., Aureli P.: Differentiation of the gene clusters encoding botulinum neurotoxin type A complexes in *Clostridium botulinum* type A, Ab, and A(B) strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7192–7199 (2004)
- Franciosa F., Hatheway C.L., Aureli P.: The detection of a deletion in the type B neurotoxin gene of *Clostridium botulinum* A(B) strains by two-step PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 442–446 (1998)
- Franciosa G., Fenicia L., Pourshaban M., Aureli P. Recovery of a strain of *Clostridium botulinum* producing both neurotoxin A and neurotoxin B from canned macrobiotic food. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1148–1150 (1997)
- Frean J., Arntzen L., van der Heever J., Perovic P.: Fatal type A botulism in South Africa, 2002. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **98**, 290–295 (2004)
- Galldiks N., W.F. Haupt i wsp.: Rapid geographical clustering of wound botulism in Germany after subcutaneous and intramuscular injection of heroin. *Neurocrit. Care.* **6**, 30–34 (2007) (praca jest dziełem 14 autorów)
- Giménez D.F., Ciccarelli A.S.: New strains of *Clostridium botulinum* subtype Af. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A.* **240**, 215–220 (1978)
- Grenda T., Kwiatek K.: *Clostridium botulinum* – charakterystyka i znaczenie epidemiologiczne. *Med. Wet.* **65**, 743–746 (2009)
- Hatheway C.L.: Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 66–98 (1990)
- [http://www.bergeys.org/outlines/bergeys\\_vol\\_3\\_outline\\_linked.pdf](http://www.bergeys.org/outlines/bergeys_vol_3_outline_linked.pdf) (12.04.2010)
- King LA, de Valk H i wsp.: Botulism and hot-smoked whitefish: a family cluster of type E botulism in France, September 2009. *Euro Surveill.* **14**, pii: 19394 (2009) (praca jest dziełem 19 autorów). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N45/art19394.pdf> (12.04.2010)

26. Korkeala H., Stengel G., Hyytiä E., Vogelsang B., Bohl A., Wihlman H., Pakkala P., Hielm S.: Type E botulism associated with vacuum-packaged hot-smoked whitefish. *Int. J. Food Microbiol.* **18**, 1–5 (1998)
27. Kortepeter M.G., Cieslak T.J., Eitzen E.M.: Bioterrorism. *J. Environ. Health.* **63**, 21–24 (2001)
28. Lindström M., Jankola H.M., Hielm S., Hyytiä E.K., Korkeala H.J.: Identification of *Clostridium botulinum* with API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II. *FEMS Imm. Med. Microb.* **24**, 267–274 (1999)
29. Lindström M., Keto R., Markkula A., Nevas M., Hielm S., Korkeala H.: Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in food and fecal material. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5694–5699 (2001)
30. Lindström M., Kiviniemi K., Korkeala H.: Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 92–104 (2006)
31. Lindström M., Korkeala H.: Laboratory diagnostics of botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 298–314 (2006)
32. Lindström M., Nevas M., Kurki J., Sauna-aho R., Latvala-Kiesilä A., Pölonen I., Korkeala H.: Type C botulism due to toxic feed affecting 52,000 farmed foxes and minks in Finland. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4718–4725 (2004)
33. Nevas M., Lindström M., Hielm S., Björkroth K.J., Peck M.W., Korkeala H.: Diversity of proteolytic *Clostridium botulinum* strains, determined by a pulsed-field gel electrophoresis approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1311–1317 (2005)
34. Parasion S., Bartoszcze M., Grylko R.: Struktura i mechanizm działania neurotoksyn bakterii rodzaju *Clostridium*. *Przegl. Epidemiol.* **61**, 519–527 (2007)
35. Peck M.W.: *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J. Appl. Microbiol.* **101**, 556–570 (2006)
36. Schiavo G., Montecucco C.: The structure and mode of botulinum and tetanus toxins (w) The Clostridia. Molecular Biology and pathogenesis, red. J. Rood, B.A. McClane, J.G. Songer, R.W. Titball, San Diego, California: Academic Press, 1997, s. 295–322.
37. Shukla H.D., Sharma S.K.: *Clostridium botulinum*: a bug with beauty and weapon. *Crit. Rev. Microbiol.* **31**, 11–18 (2005)
38. Suen J.C., Hatheway C.L., Steigerwalt A.G., Brenner D.J.: *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin group G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 375–381 (1988)
39. Truong D.D., Stenner A., Reichel S.: Current clinical applications of botulinum toxin. *Curr. Pharm. Res.* **15**, 3671–3680 (2009)
40. Weber J.T., Hibbs R.G. Jr, Darwish A., Mishu B., Corwin A.L., Rakha M., Hatheway C.L., el Sharkawy S., el-Rahim S.A., al-Hamd M.F., et al. A massive outbreak of type E botulism associated with traditional salted fish in Cairo. *J. Infect. Dis.* **167**, 451–454 (1993)



**Anna Słońska\*<sup>1</sup>, Danuta Klimuszko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedra Nauk Przedklinicznych  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w marcu 2010 r.

1. Wprowadzenie. 2. Struktura genomu i plazmidy. 3. Bakteriocy ny. 4. Klasyfikacja bakteriocyn y. 5. Organizacja operonu biosyntezy bakteriocyn y. 6. Lokalizacja operonu biosyntezy bakteriocyn y. 7. Biosynteza bakteriocyn y. 8. Mechanizm działania bakteriocyn y. 9. Bakteriocynogenność a właściwości probiotyczne bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. 10. Podsumowanie

#### **Bacteriocins produced by probiotic rods of the genus *Lactobacillus***

**Abstract:** *Lactobacillus* is a genus of non-spore-forming, non-motile, Gram-positive facultative anaerobic or microaerophilic rods. They are important part of normal human and animal bacterial flora commonly associated with the gastrointestinal tract and genitourinary tract of animals and humans. They are able to produce antimicrobial substances such as bacteriocins, lactic acid and hydrogen peroxide, which have been shown to be beneficial for controlling the overgrowth of other, potentially pathogenic, bacteria. Bacteriocins are low-molecular weight single polypeptides or polypeptide complexes having an antimicrobial activity, synthesized in ribosome and secreted by bacterial cells. Genes encoding bacteriocins have been reported to be present on plasmid or genomic DNA. Lactobacilli are commonly used in the production of probiotics – a live microbial food supplements which beneficially affect the host by improving its intestinal microbial balance. They have found wide application in probiotic products which are used to balance disturbed intestinal microflora and related dysfunctions of the gastrointestinal track.

1. Introduction. 2. Genome structure and plasmids. 3. Bacteriocins. 4. Classification of bacteriocins. 5. Operon organization of bacteriocin genes. 6. Localization of the bacteriocin operons. 7. Biosynthesis of bacteriocins. 8. Mechanism of action of bacteriocins. 9. Bacteriocinogenicity and probiotic properties of *Lactobacillus* sp. 12. Summary

---

**Słowa kluczowe:** bakteriocyny, *Lactobacillus* sp., właściwości probiotyczne

**Key words:** bacteriocins, *Lactobacillus* sp., probiotic properties

---

## **1. Wprowadzenie**

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* to Gram-dodatnie, katalazoujemne, niesporujące pałeczki bądź ziarniakopałeczki o wymiarach  $0.5\text{--}1.2 \times 1\text{--}10 \mu\text{m}$ , beztlenowe lub mikroaerofilne, należące do grupy bakterii fermentacji mlekowej – LAB (Lactic Acid Bacteria) [29, 52]. Rodzaj *Lactobacillus* obejmuje znaczą liczbę gatunków, które wykazują duży stopień zróżnicowania [95]. Obecnie do rodzaju *Lactobacillus* zaliczanych jest 145 gatunków i 27 podgatunków [28, 33]. Na podstawie podobieństwa sekwencji genów 16S rRNA zostało wyodrębnionych pięć grup filogenetycznych: *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. buchneri* i *L. plantarum* [85].

Pałeczki *Lactobacillus* powszechnie występują w wielu środowiskach, tam gdzie dostępny są węglowodany np.: w szczątkach roślinnych lub psujących się owocach [11, 29]. Stosowane są w procesach fermentacyjnych m.in. jako starterowe kultury bakteryjne do produkcji żywności fermentowanej, takiej jak produkty mleczne, kiszonki, napoje, owoce, warzywa i mięso. Zapewniają właściwy przebieg procesu zakiszania pasz zwierzęcych. Dodatkowo stanowią bardzo

ważny element naturalnej bioty ludzi i zwierząt, kolonizującej ich przewód pokarmowy i układ moczowo-płciowy [29, 77].

Bakterie fermentacji mlekowej są składnikiem probiotyków, czyli preparatów lub produktów żywnościowych zawierających kultury żywych mikroorganizmów, które podane człowiekowi i zwierzętom wywierają korzystny wpływ na organizm gospodarza poprzez poprawę równowagi bioty jelitowej [31]. Szczepy z potwierdzonymi właściwościami probiotycznymi stosowane w komercyjnych produktach żywnościowych należą do gatunków *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* i *L. fermentum* [77].

Pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* uważane są za mikroorganizmy niepatogenne. Pomimo, że posiadają status GRAS (Generalny Recognised As Safe) zanotowane zostały przypadki ich izolacji od pacjentów z obniżoną odpornością, u których wystąpiły zakażenia oportunistyczne, takie jak zapalenie wsierdza, bakteriemia, zakażenia dróg moczowych, zapalenie błon śluzowych macicy, zapalenie opon mózgowych czy głębokie ropnie i ropniaki. Jednak w żadnym z tych przypadków rola bakterii *Lactobacillus* w patogenezie zakażeń nie

---

\* Autor korespondencyjny: Katedra Nauk Przedklinicznych, Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: anex007@op.pl

została potwierdzona. Stwierdzono, że ich obecność w układzie krwionośnym może wynikać z nieprawidłowej higieny jamy ustnej, źle przeprowadzonych zabiegów stomatologicznych, uszkodzenia przewodu pokarmowego lub operacji [2, 14, 41].

Bakterie te, ze względu na fermentacyjny metabolizm, zostały podzielone na 3 grupy. Pierwsza z nich to szczepy obligatoryjnie homofermentatywne, które w wyniku fermentacji cukrów produkują kwas mlekowy. Druga grupa to szczepy fakultatywnie heterofermentatywne, które podczas fermentacji cukrów mogą produkować sam kwas mlekowy lub jeszcze dodatkowo kwas octowy, etanol i dwutlenek węgla. Natomiast trzecia grupa to szczepy obligatoryjnie heterofermentatywne, które fermentują cukry do kwasu mlekowego, kwasu octowego, etanolu i CO<sub>2</sub> [8, 71, 95].

## 2. Struktura genomu i plazmidy

Najlepiej poznanym przedstawicielem rodzaju *Lactobacillus* jest *L. plantarum* WCFS1, którego genom ma wielkość 3308274 pz, z 3052 otwartymi ramkami odczytu i zawartością par zasad G+C wynoszącą 44,5% [51].

Zastosowanie techniki PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) dostarczyło pierwszych szacunkowych ocen wielkości chromosomalnego DNA u bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [19, 50]. Badania Roussel i wsp. pozwoliły na określenie wielkości genomu szczepów *L. gasseri* i *L. acidophilus*, które odpowiednio wynoszą 1 850 000 pz i 2 000 000 pz [79]. Są to relatywnie małe genomy, jeśli porówna się je z genomami bakterii, takich jak *E. coli* (4 700 000 pz), *Bacillus cereus* (5700000 pz) czy *Salmonella enterica* (4 800 000 pz).

Mniejsze rozmiary genomu bakterii *Lactobacillus*, szczególnie tych występujących w przewodzie pokarmowym, mogą wynikać z ich przystosowania do naturalnych miejsc bytowania, bogatych w składniki odżywcze, w których wiele genów dla szlaków biosyntetycznych stało się niepotrzebnych. Morishita i wsp. wykazali, że takie szczepy *Lactobacillus* mogą nieść mutacje hamujące biosyntezę aminokwasów (te szczepy przestają być prototrofami). Mogły one również wyeliminować ze swojego genomu geny niektórych szlaków biosyntetycznych, jako rezultat ewolucji w środowiskach bogatych w składniki odżywcze [50, 64]. Zmiany w genomach powstające podczas adaptacyjnej ewolucji bakterii w różnych środowiskach, mogą częściowo tłumaczyć heterogeniczność rodzaju i różnorodność w obrębie gatunku [50].

Plazmidy to pozachromosomowe ruchome elementy genetyczne, zdolne do autonomicznej replikacji i stabilnego utrzymywania się w komórce gospodarza, niezawierające genów metabolizmu podstawowego. Mogą

one nieść geny oporności na antybiotyki, geny kodujące bakteriocyny i enzymy szlaków metabolicznych czy geny warunkujące zdolność do koniugacji [101].

Pierwsze plazmidy w komórkach bakterii *Lactobacillus* zostały odkryte u szczepu *Lactobacillus casei* przez Chass'y'ego i wsp. w 1976 roku [17]. W kolejnych latach pojawiło się wiele prac dotyczących plazmidów obecnych w komórkach tych bakterii, wyizolowanych z materiału roślinnego [23], mięsa [3], kiszzonek [39], zakwasu [58, 94] i przewodu pokarmowego [47, 56]. Z badań tych wynika, że wiele gatunków pałeczek *Lactobacillus*, choć nie wszystkie, posiada jeden lub więcej plazmidów (zazwyczaj od 1 do 10) [72, 100]. Jedynie w przypadku szczepów *Lactobacillus plantarum* wykazano obecność plazmidów we wszystkich szczepach, pomimo, że izolowane były z różnych środowisk [39, 48]. Dodatkowo Ruiz-Barba i wsp. odkryli, że szczep *L. plantarum* LPC25 niesie aż 16 plazmidów [81].

Około 38% gatunków należących do rodzaju *Lactobacillus* zawiera plazmidy, których wielkość waha się od 1200 pz do 1690 pz [71, 100]. U większości gatunków występują małe plazmidy o wielkości poniżej 10000 pz. [100]. Duże plazmidy (powyżej 100000 pz) zostały odkryte u szczepów: *L. acidophilus* (pPM68, 110000 pz), *L. gasseri* CNRZ222 (150000 pz), *L. plantarum* (dwa plazmidy: 108000 pz i 169000 pz) [59, 65, 79].

Przeważająca większość plazmidów znalezionych u bakterii *Lactobacillus* to małe plazmidy kryptyczne. Część z nich została zsekwencjonowana i stwierdzono, że kodują one jedynie białka niezbędne do ich replikacji. Należą do nich plazmidy występujące u szczepów: *L. plantarum* (pA1, pLP1, p8014-2, pC30i1, pLB4), *L. pentosus* (p353-2), *L. helveticus* (pLJ1), *L. hilgardii* (pLAB1000) [50, 72].

Istnieją również plazmidy, których obecność warunkuje specyficzne właściwości bakterii. Takie plazmidy niosą ze sobą geny kodujące metabolizm glukozy [57] i innych węglowodanów [18], aminokwasów [87], produkcję N-acetyl-glukozaminy [93], oporność na antybiotyki [6], produkcję bakteriocyn i oporność na bakteriocyny [65] oraz wytwarzanie śluzu [3].

Znaczna większość plazmidów, zlokalizowana w szczepach dzikich, jest segregacyjnie stabilna i hodowla takich szczepów w warunkach laboratoryjnych nie ma widocznego wpływu na obecność tych struktur w komórkach bakterii [72]. Jednym z wyjątków są plazmidy występujące u szczepów należących do rodzaju *Lactobacillus*, na których stabilność ma wpływ wiele czynników, takich jak stosowanie antybiotyków, podłoża, temperatura inkubacji, czy też sposób przechowywania komórek [100].

Badania Sina wykazały, że na stabilność plazmidów mają wpływ warunki hodowli. Przedmiotem



jego badań był szczep *L. plantarum* caTC2, niosący trzy plazmidy (6500, 8500, 10600 pz), który był hodowany na różnych podłożach zawierających 2% glukozy, maltozy lub laktozy, w temperaturze 30°C i 21°C przez 7 dni. Autor stwierdził, że szczep hodowany na podłożu z laktozą w temperaturze 21°C utracił jeden z plazmidów (8500 pz) [89, 90]. Z kolei badania Von Husby i Nes ujawniły, że przechowywanie przez 7 lat szczepu *L. plantarum* DSM1959, mającego sześć plazmidów, spowodowało utratę dwóch z nich (pNI2 i pNI3) oraz pojawienie się jednego nowego (pNI5) [99]. Dodatkowo niektóre cechy przekazywane przez plazmidy, takie jak wykorzystanie maltozy czy galaktozy, mogą być dziedziczone niestabilnie [44, 57].

Względna niestabilność charakteryzująca duże plazmidy nie została stwierdzona w odniesieniu do małych kryptycznych plazmidów. W szczepach *L. plantarum* i *L. pentosus* zostały odkryte takie plazmidy, które nie mogą być wyeliminowane przez hodowlę w subletalnych temperaturach lub w obecności akryflawiny czy nowobiocyny, a więc w warunkach zwykle stosowanych do leczenia większości szczepów z plazmidów [12, 53]. Obecność tych małych plazmidów może dawać szczepom selekcyjną przewagę nad szczepami pozbawionymi tych struktur w warunkach pozalaboratoryjnych, mimo, że nie kodują one genów ważnych dla komórki [72].

### 3. Bakteriocyyny

Bakterie kwasu mlekowego odgrywają zasadniczą rolę w procesach fermentacji żywności. Są one alternatywą dla chemicznych konserwantów spożywczych, od kiedy wiadomo, że ich komórkowe metabolity, takie jak: kwasy organiczne (głównie kwas mlekowy i octowy), nadtlenek wodoru oraz bakteriocyyny, hamują wzrost bakterii patogennych i organizmów zanieczyszczających żywność i powodujących jej psucie [20].

Doskonałym przykładem szczepów wytwarzających naturalne konserwanty spożywcze są pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*, licznie zasiedlające przewód pokarmowy ludzi i zwierząt. Wprowadzenie bakterii do układu pokarmowego gospodarza, pozwala skutecznie regulować skład bioty jelitowej, stymulować układ odpornościowy i usprawnić perystaltykę jelit.

Bakteriocyyny to niskocząsteczkowe związki chemiczne zbudowane z prostych peptydów lub kompleksów polipeptydów, wykazujące właściwości antybakteryjne, zazwyczaj wobec gatunków blisko spokrewnionych z producentem [42]. Produkowane są przez bakterie Gram-dodatnie, takie jak: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* oraz bakterie Gram-ujemne, takie jak: *E. coli*, *Pseudomonas* [11]. Bakterie te są odporne

na wytwarzaną przez siebie bakteriocyne, ponieważ dodatkowo kodują białka blokujące aktywność bakteriocyyny we wnętrzu komórki bakterii.

Bakteriocyyny produkowane przez pałeczki *Lactobacillus* były obiektem badań w okresie minionych dziesięcioleci. Szczególną uwagę poświęcono tym szczepom *Lactobacillus*, które stosowano do produkcji fermentowanej żywności, głównie produktów z mleka, mięsa i warzyw. Badania Barefoota i Klarenhammery wykazały, że 63% z 52 przebadanych szczepów *L. acidophilus* produkuje bakteriocyyny [10]. Wytwarzane przez nie bakteriocyyny hamowały rozwój blisko spokrewnionych szczepów *Lactobacillus* (*L. helveticus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*) oraz *Enterococcus faecalis* [50].

### 4. Klasyfikacja bakteriocyyn wytwarzanych przez bakterie Gram-dodatnie

Bakteriocyyny produkowane przez bakterie Gram-dodatnie po raz pierwszy zostały sklasyfikowane przez Klarenhammery w 1993 roku [49]. Klasyfikacja ta była wielokrotnie modyfikowana i obecnie uwzględnia się cztery główne klasy bakteriocyyn, w obrębie których utworzone zostały podklasy [5, 38, 67].

Klasa I obejmuje lantibiotyki, będące temostabilnymi peptydami o masie cząsteczkowej poniżej 5 kDa. Zawierają one w składzie nietypowe aminokwasy, takie jak lantionina lub 3-metylolantionina. Podzielono je na dwa typy. Do typu A należą liniowe peptydy obdarzone dodatnim ładunkiem, o masie cząsteczkowej od 2,164 do 3,488 kDa, których mechanizm działania polega na tworzeniu porów w błonie komórkowej bakterii. Typ B to bakteriocyyny o budowie cyklicznej, mające ładunek ujemny lub pozbawione ładunku, o masie cząsteczkowej od 1,959 do 2,041 kDa [42].

Do klasy II należą bakteriocyyny nielantibiotykowe, które nie zawierają w swoim składzie lantioniny. Są to termostabilne peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa. Na podstawie różnic w ich budowie wyodrębnione zostały trzy podklasy. Do podklasy IIa zalicza się pedicynopodobne bakteriocyyny o silnej aktywności wobec bakterii z rodzaju *Listeria*. Podklasa IIb obejmuje bakteriocyyny dipeptydowe, które do uzyskania pełnej aktywności antybakteryjnej wymagają działania kompleksu złożonego z dwóch peptydów. Do podklasy IIc należą bakteriocyyny wydzielane na drodze sekrecji typu Sec.

Klasa III skupia bakteriocyyny o dużej masie cząsteczkowej (>30 kDa), termolabilne, produkowane głównie przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* [20, 42, 69].

Klasa IV obejmuje bakteriocyyny, które do uzyskania pełnej aktywności wymagają obecności części lipidowej lub węglowodanowej w cząsteczce. Istnienie

czwartej klasy zostało stwierdzone w wyniku obserwacji, że aktywność niektórych bakteriocyn jest niszczone przez działanie enzymów glikolitycznych lub lipolitycznych [42, 43, 84].

## 5. Organizacja operonu biosyntezy bakteriocyn

Geny kodujące produkcję bakteriocyn zorganizowane są w postaci operonowych klastrów. Najprostszy klastr zbudowany jest z co najmniej dwóch genów: genu kodującego białko strukturalne – bakteriocynę oraz genu kodującego białko oporności na nią. Taka budowa operonu, złożonego tylko z dwóch genów, charakterystyczna jest dla bakteriocyn klasy IIc, wydzielanych na drodze sekrecji z udziałem białek Sec, do których należy diwergencyna A, produkowana przez *Carnobacterium divergens* [26, 102].

W większości przypadków, wydzielanie bakteriocyn wymaga specyficznego mechanizmu eksportowego, który podlega wielu czynnikom regulacyjnym, co czyni taki operon dużo bardziej skomplikowanym. Ogólna organizacja genów biosyntezy bakteriocyn klasy IIa i IIb jest bardzo podobna i sprowadza się do układu złożonego z strukturalnego genu kodującego peptyd prekursorowy, genu oporności, genów ABC-transportera (ATP-binding cassette) oraz białka pomocniczego. W niektórych przypadkach, dodatkowo mogą wystąpić geny regulatorowe [26].

Przykładem bakteriocyny pedicynopodobnej, należącej do klasy IIa, jest pediocyna AcH. Zawiera ona N-końcowy peptyd sygnałny złożony z dwóch reszt glicynowych, który jest odcinany równocześnie z sekrecją bakteriocyny z komórki przez ABC-transportery. Operon biosyntezy pediocyny AcH złożony jest z czterech genów: genu kodującego pre-pedicynę (*papA*), genu kodującego białko oporności (*papB*) oraz dwóch genów regulujących mechanizm sekrecji, niezbędnych w czasie translokacji bakteriocyny przez błonę i podczas odcinania peptydu liderowego (*papC* i *papD*) [15].

Sakacyna A, produkowana przez *L. sakei*, jest również pedicynopodobną bakteriocyną, jednakże jej operon wykazuje odmienną budowę. Złożony jest z dwóch części rozdzielonych sekwencją *IS1163* i składa się z sześciu genów kodujących: pre-sakacynę (*sapA*), białko oporności (*saiA*), kinazę histydynową (*sapK*), białko regulatorowe (*sapR*), ABC-transporter (*sapT*) oraz białko transportowe (*sapE*) [7].

Najbardziej skomplikowaną budowę operonu mają lantibiotyki, co wynika z tego, że jako jedyne ulegają całkowitej potranslacyjnej modyfikacji. Operon biosyntezy lantibiotyków zawiera geny kodujące: prepeptyd (*LanA*), białka oporności, chroniące przed działaniem bakteriocyn (*LanI/LanE/LanF/LanG*), białka

transportowe biorące udział w wydzielaniu przez błonę – ABC-transportery (*LanT*), proteinazę odcinającą peptyd liderowy (*LanP*), enzymy odpowiedzialne za modyfikacje (*LanB*, *C/LanM*) oraz białka regulatorowe (*LanK*, *R*) [84].

## 6. Lokalizacja operonu biosyntezy bakteriocyn

Synteza bakteriocyn zachodzi pod kontrolą genów zlokalizowanych na bakteryjnym chromosomie, na plazmidach lub na transpozonach (zarówno na plazmidzie, jak i w chromosomie).

Chromosomalna lokalizacja operonu została potwierdzona dla bakteriocyn klasy I: mutacyny II i mutacyny III (*Streptococcus mutant*), saliwarycyny A (*Streptococcus salivarius*) oraz klasy II: enterocyny A i B (*Enterococcus faecium*), diwergency V41 (*Carnobacterium divergens*), laktacyjny F (*L. johnsonii*) oraz plantarycyny A i S (*L. plantarum*) [4, 25, 26, 30, 43, 68, 73, 74, 78, 102].

Znacznie częściej operony bakteriocyn zlokalizowane są na plazmidach. Taka lokalizacja sprzyja wewnątrz- i międzygatunkowemu rozpowszechnianiu się genów kodujących bakteriocyny wśród bakterii fermentacji mlekowej. Bakteriocyny kodowane przez geny plazmidowe to: laktycyna 481 i laktycyna 3147 (*L. lactis*), pediocyna PA-1 i pediocyna AcH (*Pediococcus acidilactici*), sakacyna A (*L. sakei*), diwergencyna A (*Carnobacterium divergens*), enterocyna P (*Enterococcus faecium*) i inne [7, 15, 22, 26, 60, 70, 102].

Nietypową lokalizację operonu wykazuje nielantibiotykowa bakteriocyna – karnobakteriocyna BM1, produkowana przez *Carnobacterium piscicola*. Podczas, gdy jej gen strukturalny znajduje się na bakteryjnym chromosomie, jego ekspresja uzależniona jest od obecności plazmidu (61000 pz), który zawiera geny niezbędne do transportu bakteriocyny i geny kodujące białka oporności [26, 75].

## 7. Biosynteza bakteriocyn

Bakteriocyny syntetyzowane są na rybosomach w postaci prepeptydów, które następnie są przekształcane w dojrzałe peptydy i wydzielane poza komórkę producenta za pomocą odpowiedniego mechanizmu transportowego [66]. Produkcja bakteriocyny związana jest z procesem wzrostu komórek bakterii i najintensywniej zachodzi w czasie fazy wzrostu logarytmicznego [84].

Większość bakteriocyny wyposażonych jest w N-końcowy peptyd sygnałny, który jest odcinany przed lub podczas sekrecji bakteriocyny z komórki. Ogólny szlak biosyntezy bakteriocyn składa się z kilku etapów:

syntezy prepeptydu, odcięcia peptydu sygnałowego oraz transportu zmodyfikowanego prepeptydu lub dojrzałego peptydu przez błonę cytoplazmatyczną. Schemat ten wykazuje pewne różnice, w zależności od klasy bakteriocyny.

Szlak biosyntezy lantybiotyków jest najbardziej skomplikowany. Lantybiotyki różnią się od innych bakteriocyn, ponieważ jako jedyne podlegają całkowitym potranslacyjnym modyfikacjom, które dotyczą reszt seryny, treoniny i cysteiny. Zwykle hydroksyaminokwasy – seryna i treonina (Ser i Thr) ulegają dehydratacji, odpowiednio, do form didehydroalaniny (Dha) i didehydrobutyniny (Dhb). Następnie  $\alpha,\beta$ -nienasycone reszty Dha i Dhb ulegają reakcji substytucji nukleofilowej grup SH z reszty cysteiny, co prowadzi do powstania lantioniny (Lan) i 3-metylolantioniny (MeLan), form charakterystycznych dla lantybiotyków. Dodatkowo lantybiotyki w oparciu o przebieg biosyntezy, zostały podzielone na trzy grupy, które nie mają związku z opisanym wyżej podziałem na typ A i typ B [82, 97].

Do pierwszej grupy należą nizyna, subtilina i epidermina. Biosynteza tych lantybiotyków wymaga obecności dwóch enzymów modyfikacyjnych: enzymu *LanB*, biorącego udział w reakcji dehydratacji oraz enzymu *LanC*, odpowiadającego za powstanie tioeteru [45, 62]. Następnie od zmodyfikowanego prepeptydu zostaje odcięty peptyd sygnałowy (*LanP*), a dojrzały peptyd jest transportowany przez ABC-transporter (*LanT*) poza komórkę [46, 88, 97].

Druga grupa, do której należą laktocyna 481, mutacyna II i saliwarycyna A, to lantybiotyki modyfikowane przez jeden enzym – *LanM*. Modyfikacja ta ma miejsce równocześnie z transportem bakteriocyny przez ABC-transporter [97, 98].

Do trzeciej grupy należy laktocyna S, stafylokokocyna C55 i laktocyna 3147. Ta grupa bakteriocyn również modyfikowana jest przez jeden enzym – *LanM*, jednakże modyfikacja następuje przed ich sekrecją, co odróżnia je od bakteriocyn grupy drugiej [92, 97].

Bakteriocyny należące do klasy II, w odróżnieniu od lantybiotyków, podlegają minimalnej modyfikacji. Syntetyzowane są w postaci prepeptydów z N-końcowym peptydem sygnałowym, zawierającym dwie reszty glicynowe, odcinanym równocześnie z sekrecją bakteriocyny z komórki przez odpowiedni ABC-transporter. Wyjątek stanowią bakteriocyny klasy IIc, które wydzielane są na drodze sekrecji przy udziale białek Sec [40, 84, 102].

Bakteriocyny są cząsteczkami o charakterze kationowym, zawierającymi regiony hydrofobowe lub/i hydrofilowe. Wykazują duże zróżnicowanie pod względem długości łańcucha, sekwencji i składu aminokwasów, potranslacyjnej modyfikacji, sekrecji i aktywności antybakteryjnej. Nie tracą aktywności w środowisku

o niskim pH, co szczególnie dotyczy bakteriocyn klasy I i IIa. González i wsp. wykazali, że plantarocyna C jest stabilna w kwaśnym i neutralnym pH, natomiast inkubacja w warunkach alkalicznego pH powoduje jej odwracalną inaktywację [36]. Ponadto, bakteriocyny należące do wyżej wymienionych klas, wykazują dużą termostabilność przy kwaśnym pH, która obniża się wraz z jego wzrostem. Ze względu na swoją białkową naturę szybko ulegają inaktywacji w wyniku działania proteaz, głównie trypsyny,  $\alpha$ -chymotrypsyny oraz pepsyny.

## 8. Mechanizm działania bakteriocyn

Oddziaływanie bakteriocyn na komórki wrażliwe może mieć charakter bakteriobójczy lub bakteriostatyczny. Większość bakteriocyn wykazuje bakteriobójcze działanie, powodując gwałtowne zmniejszenie populacji bakterii wrażliwych.

Mechanizm działania bakteriocyn polega na destabilizacji błony cytoplazmatycznej wrażliwych bakterii poprzez tworzenie w niej przejściowych kompleksów poracyjnych i kanałów jonowych. Towarzyszy temu bierny wpływ małych cząsteczek, takich jak: jony potasu, magnezu i fosforu, aminokwasy i ATP. W efekcie dochodzi do zaburzenia potencjału membranowego, gradientu pH i zahamowania funkcji pompy protonowej. Niski poziom ATP i niedobór jonów w komórce prowadzi do zahamowania syntezy DNA, RNA, białek i polisacharydów. Zahamowanie aktywnego transportu składników odżywczych powoduje śmierć komórki bakteryjnej [13, 63].

Taki mechanizm działania został zaobserwowany między innymi u *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, bakterii wyizolowanej z brazylijskiej kiełbasy wieprzowej. Wykazano, że bakteria ta potrafi hamować wzrost *Listeria monocytogenes* w pożywkach, systemach spożywczych i w mysim przewodzie pokarmowym. Bakteriocyna produkowana przez ten szczep – sakacyna P, powoduje formowanie porów w błonie komórkowej i rozproszenie protonowej siły motorycznej wrażliwych komórek szczepu *L. monocytogenes* Scott A. Dochodzi również do obniżenia koncentracji wewnątrzkomórkowego ATP oraz do wpływu 5(6)-karboksylfluoresceiny z liposomów [9, 24].

Innym mechanizmem działania bakteriocyn na wrażliwe komórki jest zdolność do wywoływania lizy komórki. Ma to miejsce wówczas, gdy bakteriocyna wchodzi w interakcję z kwasami: teichojowym, lipo-teichojowym lub teichuronowym, będącymi składnikami ściany komórkowej. Dochodzi do uwolnienia i aktywacji związanych z tymi kwasami enzymów autolitycznych, co w efekcie prowadzi do autolizy komórki. Takie działanie ma miejsce w przypadku

plantarycyny C wytwarzanej przez *Lactobacillus plantarum* LL441. W swoich badaniach Gonzalez i wsp. wykazali, że bakteriocyna ta powoduje całkowitą lizę komórek szczepu *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LMG 13551 [36, 42]

Bakteriocyny, takie jak nizyna czy większość lantibiotyków, dodatkowo mogą zaburzać procesy biosyntezy ściany komórkowej. Hamują syntezę peptydoglikanu na poziomie transglikozylacji, przy czym biosynteza DNA, RNA i białek zachodzi bez zakłóceń [34, 63].

## 9. Bakteriocynogenność a właściwości probiotyczne bakterii z rodzaju *Lactobacillus*

Bakterie należące do rodzaju *Lactobacillus* są bardzo często stosowane w preparatach probiotycznych. Szczepy mające potwierdzone właściwości probiotyczne i stosowane jako probiotyki należą do gatunków: *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. salivarius* i *L. plantarum*. Wszystkie wyżej wymienione gatunki zasiedlają przewód pokarmowy ludzi i zwierząt. Wyjątek stanowią szczepy *L. bulgaricus*, które stosowane są jako starterowe kultury baktericyjne do produkcji żywności fermentowanej [31].

Termin probiotyki, z greckiego *pro bios* – „dla życia”, po raz pierwszy został użyty przez Lilly i Stillwell'a w 1965 roku do opisanego substancji wydzielanych przez jeden mikroorganizm, które pobudzają wzrost drugiego [55, 86]. W miarę rozwoju nauki pojawiające się w literaturze definicje probiotyków były modyfikowane, rozszerzane i uzupełniane o nowe elementy. Aktualnie za probiotyki uważa się preparaty lub produkty żywnościowe zawierające żywe mikroorganizmy, które wywierają korzystny wpływ na organizm gospodarza, poprzez poprawę równowagi bioty jelitowej, a co za tym idzie pozytywnie wpływają na wzrost i rozwój zwierząt [31, 37].

Głównym zadaniem bakterii probiotycznych jest utrzymanie równowagi mikrobiologicznej przewodu pokarmowego, zarówno ilościowej, jak i jakościowej. Bakterie będące składnikiem preparatów probiotycznych powinny cechować się następującymi właściwościami: zdolnością do szybkiego, dynamicznego namnażania się i do kolonizacji przewodu pokarmowego, konkurencyjnością o składniki pokarmowe w stosunku do bioty patogennej, odpornością na niskie pH żołądka i na kwasy żółciowe w jelitach, zdolnością do wytwarzania substancji o właściwościach bakteriostatycznych lub bakteriobójczych, brakiem właściwości patogennych lub toksycznych dla organizmu gospodarza [31].

Mechanizm działania probiotyków, na który składa się wiele czynników, nie został jeszcze dobrze poznany. Na podstawie badań Fullera można stwierdzić, że

oddziaływanie probiotyków następuje poprzez interakcje zachodzące pomiędzy szczepami probiotycznymi i bakteriami patogennymi. Dotyczy to przede wszystkim współzawodnictwa o składniki odżywcze i o miejsce do adhezji. Pałeczki *Lactobacillus* stwarzają niekorzystne środowisko dla bakterii chorobotwórczych, ponieważ produkują związki obniżające pH w przewodzie pokarmowym i działające hamująco na wzrost sąsiadujących bakterii. Między innymi należą do nich opisane wyżej bakteriocyny [31, 37].

Działanie antybakteryjne bakteriocyn najsilniej skierowane jest wobec mikroorganizmów blisko spokrewnionych ze szczepem wytwarzającym określoną bakteriocynę. Definicja ta dotyczy większości bakteriocyn. Jednak najnowsze badania wykazują, że wiele z nich może hamować rozwój bakterii, należących do innych gatunków niż producent.

Ze względu na zakres działania wyróżniono trzy grupy bakteriocyn: 1) o wąskim spektrum aktywności, działające na szczepy wewnątrz tego samego gatunku, 2) wykazujące umiarkowany zakres aktywności, skierowanej również na inne rodzaje bakterii niż producent, w tym wiele organizmów patogennych (np.: *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*), 3) o szerokim zakresie inhibicji, obejmującej bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz spory bakterii przetrwalnikujących [34].

Najlepiej poznaną bakteriocyną należącą do klasy I jest nizyna, produkowana przez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Nizyna charakteryzuje się szerokim zakresem aktywności antybakteryjnej skierowanej zarówno przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, takim jak: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Listeria* i *Mycobacterium*, jak i bakteriom gramujemnym (*E. coli* i *Salmonella*). Zapobiega również tworzeniu przetrwalników i hamuje rozwój komórek vegetatywnych bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium* [1, 20, 21, 32].

Bakteriocynami wykazującymi wąski zakres aktywności są laktokokcyna A produkowana przez *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* oraz acydocyna J1132 produkowana przez *L. acidophilus* JCM 1132, które hamują rozwój szczepów należących do tego samego gatunku [40, 96].

Na korzystny wpływ pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* składa się nie tylko ich zdolność do wytwarzania bakteriocyn. Bakterie te produkują również inne substancje o działaniu antybakteryjnym, takie jak kwasy organiczne czy nadtlenek wodoru. Antybakteryjny wpływ kwasów organicznych wynika z gwałtownego obniżenia pH w przewodzie pokarmowym, co powoduje inhibicję aktywności biochemicznej mikroorganizmów przez niezdysocjowane cząsteczki kwasu [91]. Natomiast nadtlenek wodoru hamuje roz-

wój i zabija te bakterie, które nie wytwarzają enzymów takich jak katalaza czy peroksydaza [27].

Preparaty probiotyczne zawierające pałeczki *Lactobacillus* wytwarzające bakteriocyny wykazują również działanie antynowotworowe. Mogą hamować wzrost niektórych komórek nowotworowych [76], ograniczać rozwój bakterii syntetyzujących enzymy (np.:  $\beta$ -glukozydazy,  $\beta$ -glukuronidazy, azoreduktazy) katalizujące przemiany związków prokancerogennych do kancerogennych oraz usuwać związki rakotwórcze pochodzące z diety lub tworzone przez bakterie chorobotwórcze w jelitach, poprzez skrócenie czasu pasażu treści pokarmowej przez przewód pokarmowy [16, 31, 35]. Bakterie fermentacji mlekowej zdolne są do hamowania aktywności nitroreduktazy (odpowiedzialnej za syntezę nitrozoamin), jak również do wiązania nitrozoamin i innych substancji mutagennych, takich jak azotobarwniki czy mykotoksyny [31, 35, 80]. Takie działanie antynowotworowe wykazuje plantarycyna A produkowana przez *Lactobacillus plantarum* C11. Badania Sand'a i wsp. prowadzone na rakowych i normalnych komórkach przysadki szczura wykazały, że plantarycyna A powoduje permabilizację błony komórek rakowych, a co za tym idzie ich zniszczenie [83].

Bakterie probiotyczne wspomagają również specyficzne i niespecyficzne mechanizmy obronne człowieka i zwierząt. Badania McCracken'a i współpracowników (1999) wykazały, że codzienne wzbogacenie diety o  $10^9$ – $10^{12}$  komórek bakterii probiotycznych już po kilku tygodniach może spowodować wzrost liczby komórek bójczych w surowicy krwi oraz zwiększyć aktywność makrofagów i limfocytów [61]. Dodatkowo, niektóre szczepy mogą indukować wytwarzanie cytokin, immunoglobulin, interferonu  $\alpha$  i  $\beta$  (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) oraz czynnika martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ) [11].

Inne korzystne działania probiotyków potwierdzono w zapobieganiu i łagodzeniu biegunek bakteryjnych i wirusowych, leczeniu nawykowych zaparć i chorób zapalnych jelit, alergiach pokarmowych, nietolerancji laktozy, obniżaniu poziomu cholesterolu we krwi, zakażeniach układu moczowego, profilaktyce osteoporozy oraz leczeniu zaburzeń równowagi bioty jelitowej np. po kuracji antybiotykowej.

## 10. Podsumowanie

W ostatnich latach bardzo dużo uwagi poświęca się prozdrowotnym właściwościom niektórych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, które tradycyjnie stosowane są do produkcji żywności fermentowanej, tj. serów, jogurtów, fermentowanych kiełbas, kapusty kiszonej, wina czy piwa. Powszechnie wiadomo, że długotrwałe stosowanie antybiotyków prowadzi do zniszczenia naturalnej bioty jelitowej, kumulowania się

w organizmie szkodliwych substancji oraz powstawania antybiotykoopornych szczepów bakterii patogennych. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mają zdolność do wytwarzania substancji działających antagonistycznie na szereg drobnoustrojów, w tym wiele gatunków chorobotwórczych. Najważniejsze z nich są bakteriocyny, które wytwarzane są przez większość szczepów z rodzaju *Lactobacillus*.

W związku z licznymi zagrożeniami wynikającymi z używania antybiotyków, Parlament Europejski wydał rozporządzenie na mocy którego z dniem 1 stycznia 2006 roku w krajach Unii Europejskiej wprowadzono całkowity zakaz stosowania antybiotyków paszowych w żywieniu zwierząt (Rozporządzenie nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt). Dlatego też alternatywą dla antybiotyków stosowanych jako dodatki do pasz zwierzęcych stały się preparaty probiotyczne, których efekty działania są zbliżone do efektów uzyskanych podczas stosowania antybiotyków jako dodatków paszowych. Jedne i drugie, mimo że ich mechanizm działania jest odmienny, są stymulatorami wzrostu i redukują liczbę bakterii chorobotwórczych. Jednakże w przypadku stosowania probiotyków nie występują efekty uboczne, nie są odkładane szkodliwe substancje, jak również nie istnieje niebezpieczeństwo ich przedawkowania. Dlatego z punktu widzenia zarówno konsumenta, jak i producenta żywności, jest to sposób na otrzymanie bezpiecznej żywności [31, 54].

## Piśmiennictwo

1. Abee T., Krockel L., Hill C.: Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 169–185 (1995)
2. Aguirre M., Collins M.D.: Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 95–107 (1993)
3. Ahrné S., Molin G., Stahl S.: Plasmids in *Lactobacillus* isolated from meat and meat products. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**, 320–325 (1989)
4. Allison G.E., Fremaux C., Klaenhammer T.R.: Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* **176**, 2235–2241 (1994)
5. Asaduzzaman S.M., Sonomoto K.: Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *J. Biosci. Bioeng.* **107**, 475–487 (2009)
6. Axelsson L.T., Ahrné S.E.I., Andersson M.C., Stahl S.R.: Identification and cloning of a plasmid-encoded erythromycin resistance determinant from *Lactobacillus reuteri*. *Plasmid*, **20**, 171–174 (1988)
7. Axelsson L.T., Holck A.: The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* **177**, 2125–2137 (1995)
8. Baele M., Vaneechoutte M., Verhelst R., Vancanneyt M., Devriese L.A., Haesebrouck F.: Identification of *Lactobacillus*

- species using tDNA-PCR. *J. Microbiol. Methods*, **50**, 263–271 (2002)
9. Bambirra F.H.S., Lima K.G.C., Franco B.D.G.M., Carmona D.C.M., Nardi R.M.D., Barbosa F.H.F., Nicoli J.R.: Protective effect of *Lactobacillus sakei* 2a against experimental challenge with *Listeria monocytogenes* in gnotobiotic mice. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 663–667 (2007)
  10. Barefoot S.F., Klaenhammer T.R.: Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1808–1815 (1983)
  11. Biniek M., Blaszczyk B., Kizerwetter-Świda M.: Badania ukierunkowane w zakresie regularnych gramdodatnich pałeczek, w: red. K. Malicki, M. Biniek: Zarys klinicznej bakteriologii weterynaryjnej. Wyd. SGGW, Warszawa 2004, s. 279–293
  12. Bringel F., Frey L., Hubert J.C.: Characterization, cloning, curing, and distribution in lactic acid bacteria of pLP1, a plasmid from *Lactobacillus plantarum* CCM 1904 and its use in shuttle vector construction. *Plasmid*, **22**, 193–202 (1989)
  13. Brogden K.A.: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238–250 (2005)
  14. Brouqui P., Raoult D.: Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 177–207 (2001)
  15. Bukhtiyarova M., Yang R., Ray B.: Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3405–3408 (1994)
  16. Burns A.J., Rowland I.R.: Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **1**, 13–24 (2000)
  17. Chassy B.M., Gibson E., Giuffrida A.: Evidence for extrachromosomal elements in *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1576–1578 (1976)
  18. Chassy B.M., Gibson E., Giuffrida A.: Evidence for plasmid-associated lactose metabolism in *Lactobacillus casei*. *Current Microbiol.* **1**, 141–144 (1978)
  19. Chevallier B., Hubert J.C., Kammerer B.: Determination of chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **120**, 51–56 (1994)
  20. Chin H.S., Shim J.S., Kim J.M., Yang R., Yoon S.S.: Detection and Antibacterial Activity of A Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Sci. Biotechnol.* **10**, 335–341 (2001)
  21. Cintas L.M., Casaus P., Fernández M.F., Hernández P.E.: Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* **15**, 289–298 (1998)
  22. Cintas L.M., Casaus P., Hlvarstein L.S., Hernández P.E., Nes I.F.: Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4321–4330 (1997)
  23. Daeschel M.A., Andersson R.E., Fleming H.P.: Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 357–367 (1987)
  24. de Carvalho K.G., Bambirra F.H.S., Kruger M.F., Barbosa M.S., Oliveira J.S., Santos A.M.C., Nicoli J.R., Bemquerer M.P., de Miranda A., Salvucci E.J., Sesma F.J.M., Franco B.D.G.M.: Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 381–390 (2010)
  25. Diep D.B., Håvarstein L.S., Nissen-Meyer J., Nes I.F.: The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 160–166 (1994)
  26. Dimov S., Ivanova N., Harizanova N.: Genetics of bacteriocins biosynthesis by lactic acid bacteria. *Biotechnol. & Bio-technol. Eq.* **19**, 4–10 (2005)
  27. Eschenbach D.A., Davick P.R., Williams B.L., Klebanoff S.J., Young-Smith K., Critchlow C.M., Holmes K.K.: Prevalence of Hydrogen Peroxide-Producing *Lactobacillus* Species in Normal Women and Women with Bacterial Vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 251–256 (1989)
  28. Euzéby J.P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Lactobacillus*. Copyright © J.P. Euzéby. Internet: <http://www.bacterio.cict.fr/> (2008)
  29. Felis G.E., Dellaglio F.: Taxonomy of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* **8**, 44–61 (2007)
  30. Franz C.M.A.P., Worobo R.W., Quadri L.E.N., Schillinger U., Holzapfel W.H., Vederas J.C., Stiles M.E.: Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2170–2178 (1999)
  31. Fuller R.: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365–378 (1989)
  32. Gálvez A., Abriouel H., López R.L., Ben Omar N.: Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 51–70 (2007)
  33. Garrity M. Bergey's Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Second Edition, released 4.0 October 2003
  34. Gniazdowska D., Trojanowska K.: Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, **1**, 114–130 (2005)
  35. Goldin B.R., Gorbach S.L.: Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements and dimethylhydrazine. *Cancer*, **40**, 2421–2426 (1977)
  36. González B., Arca P., Mayo B., Suárez J.E.: Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2158–2163 (1994)
  37. Grela E.R., Semeniuk W.: Probiotics in animal production. *Med. Wet.* **55**, 222–228 (1999)
  38. Heng N.C., Burtenshaw G.A., Jack R.W., Tagg J.R.: Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7763–7766 (2007)
  39. Hill H.A., Hill J.E.: The value of plasmid profiling in monitoring *Lactobacillus plantarum* in silage fermentations. *Curr. Microbiol.* **13**, 91–94 (1986)
  40. Holo H., Nilssen O., Nes I.F.: Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**, 3879–3887 (1991)
  41. Husni R.N., Gordon S.M., Washington J.A., Longworth D.L.: *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 1048–1055 (1997)
  42. Jack R.W., Tagg J.R., Ray B.: Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. *Microbiol. Rev.* **6**, 171–200 (1995)
  43. Jiménez-Díaz R., Ríos-Sánchez R.M., Desmazeaud M., Ruiz-Barba J.L., Piard J.C.: Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1416–1424 (1993)
  44. Kanatani K., Tahara T., Yoshida K., Miura H., Sakamoto M., Oshimura M.: Plasmid-linked galactose utilization by *Lacto-*

- bacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 826–827 (1992)
45. Karakas Sen A., Narbad A., Horn N., Dodd H. M., Parr A.J., Colquhoun I., Gasson M. J.: Post-translational modification of nisin. The involvement of NisB in the dehydration process. *Eur. J. Biochem.* **261**, 524–532 (1999)
  46. Kiesau P., Eikmanns U., Gutowski-Eckel Z., Weber S., Hammelmann M., Entian K.-D.: Evidence for a multimeric subtilin synthetase complex. *J. Bacteriol.* **179**, 1475–1481 (1997)
  47. Klaenhammer T.R., Sutherland S.M.: Detection of plasmid deoxyribonucleic acid in an isolate of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 592–600 (1980)
  48. Klaenhammer T.R.: A general method for plasmid isolation in lactobacilli. *Curr. Microbiol.* **10**, 23–28 (1984)
  49. Klaenhammer T.R.: Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39–86 (1993)
  50. Klaenhammer T.R.: Genetics of *Lactobacilli*. *Int. Dairy Journal*, **5**, 1019–1058 (1995)
  51. Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Moleenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Turchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Lankhorst R.M., Bron P.A., Hoffer S.M., Groot M.N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W.M., Siezen R.J.: Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1990–1995 (2003)
  52. Klein C., Pack A., Bonaparte Ch., Reuter G.: Taxonomy and phylogeny of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**, 103–125 (1998)
  53. Leer R.J., van Luijk N., Posno M., Pouwels P.H.: Structural and functional analysis of two cryptic plasmids from *Lactobacillus pentosus* MD353 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 265–274 (1992)
  54. Libudzisz Z., Śliżewska K., Biernasiak J.: Probiotics as alternative for antibiotics. *Chemia Spożywcza i Biotechnologia*, **984**, 79–91 (2006)
  55. Lilly D.M., Stillwell R.H.: Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, **147**, 747–748 (1965)
  56. Lin J.H.C., Savage D.C.: Cryptic plasmids in *Lactobacillus* strains isolated from the murine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1004–1006 (1985)
  57. Liu M.L., Kondo J.K., Barnes M.B., Bartholomeu D.T.: Plasmid-linked maltose utilization in *Lactobacillus* spp. *Biochimie*, **70**, 351–355 (1988)
  58. Lönner C., Preve-Akeson K., Ahrné O.: Plasmid contents of lactic acid bacteria isolated from different types of sour doughs. *Curr. Microbiol.* **20**, 201–207 (1990)
  59. Mayo B., Hardisson C., Brana A.F.: Selected characteristic of several strains of *Lactobacillus plantarum*. *Microbiologia*, **5**, 105–122 (1989)
  60. McAuliffe O., Ryan M.P., Ross R.P., Hill C., Breeuwer P., Abee T.: Lacticin 3147, a Broad-Spectrum Bacteriocin Which Selectively Dissipates the Membrane Potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 439–445 (1998)
  61. McCracken V.J., Gaskins H.R.: Probiotics and the immune system. [w:] Probiotics: a critical review. red. G. Tannock, Horizon Sci. Press 1999, s. 85–112
  62. Meyer C., Bierbaum G., Heidrich C., Reis M., Suling J., Iglesias-Wind M. I., Kempter C., Molitor E., Sahl H.-G.: Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP and PepC. Evidence for a role of PepC in thioether formation. *Eur. J. Biochem.* **232**, 478–489 (1995)
  63. Moll G.N., Konings W.N., Driessen A.J.M.: Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 185–198 (1999)
  64. Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakurai T., Takashi Y.: Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acids biosynthesis pathways. *J. Bacteriol.* **148**, 64–71 (1981)
  65. Muriana P., Klaenhammer T.R.: Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 553–560 (1987)
  66. Nes I.F., Diep D.B., Hlvarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V., Holo H.: Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 113–128 (1996)
  67. Nissen-Meyer J., Rogne P., Opegård C., Haugen H.S., Kristiansen P.E.: Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by grampositive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 19–37 (2009)
  68. O’Keeffe T., Hill C., Ross R.P.: Characterization and Heterologous Expression of the Genes Encoding Enterocin A Production, Immunity, and Regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1506–1515 (1999)
  69. Parente E., Ricciardi A.: Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 628–638 (1999)
  70. Piard J.C., Muriana P.M., Desmazeaud M.J., Klaenhammer T.R.: Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 279–284 (1992)
  71. Pot B., Ludwig W., Kersters K., Schleifer K.-H.: Taxonomy of lactic acid bacteria. In: L. de Vuyst and E. J. Vandamme (ed.), Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and Professional, London 1994, s. 13–90
  72. Pouwels P.H., Leer R.J.: Genetics of lactobacilli: plasmids and gene expression. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**, 85–107 (1993)
  73. Qi F., Chen P., Caufield P. W.: Functional Analyses of the Promoters in the Lantibiotic Mutacin II Biosynthetic Locus in *Streptococcus* mutans. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 652–658 (1999)
  74. Qi F., Chen P., Caufield P. W.: Purification of Mutacin III from Group III *Streptococcus* mutans UA787 and Genetic Analyses of Mutacin III Biosynthesis Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3880–3887 (1999)
  75. Quadri L.E., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C., Stiles M.E.: Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* **269**, 12204–12211 (1994)
  76. Reddy G.V., Shahani K.M., Banerjee M.R.: Inhibitory effect of the yoghurt on Ehrlich ascites tumor cell proliferation. *J. Nat. Cancer Inst.* **50**, 815–817 (1973)
  77. Reid G.: The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3763–3766 (1999)
  78. Ross K.F., Ronson C.W., Tagg J.R.: Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene salA from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2014–2021 (1993)
  79. Roussell Y., Colmin C., Simonet J.M., Decaris B.: Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Mocoquot). *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 549–556 (1993)

80. Rowland I.R., Grasso P.: Degradation of Nitrosamine by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* **29**, 7–12 (1975)
81. Ruiz-Barba J.L., Piarg J.C., Jiménez-Díaz R.: Plasmid profiles and curing on plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 417–421 (1991)
82. Ryan M.P., Jack R.W., Josten M., Sahl H.G., Jung G., Ross R.P., Hill C.: Extensive post-translational modification, including serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. *J. Biol. Chem.* **274**, 37544–37550 (1999)
83. Sand S.L., Haug T.M., Nissen-Meyer J., Sand O.: The Bacterial Peptide Pheromone Plantaricin A Permeabilizes Cancerous, but not Normal, Rat Pituitary Cells and Differentiates between the Outer and Inner Membrane Leaflet. *J. Membrane Biol.* **216**, 61–71 (2007)
84. Savadogo A., Ouattara C.A.T., Bassole I.H., Traore S.A.: Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 678–683 (2006)
85. Schleifer K.H., Ludwig W.: Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 461–467 (1995)
86. Schrezenmeier J., de Vrese M.: Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 361S–364S (2001)
87. Shay B.J., Egan A., Wright M., Rogers P.: Cysteine metabolism in an isolate of *Lactobacillus sake*: plasmid composition and cysteine transport. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 183–188 (1988)
88. Siegers K., Heinzmann S., Entian K.-D.: Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 12294–12301 (1996)
89. Sinha R.P.: Plasmid instability in *Lactobacillus plantarum* strain caTC2. *Curr. Microbiol.* **25**, 219–223 (1992)
90. Sinha R.P.: Stability of plasmid in *Lactobacillus plantarum* caTC2R as affected by carbohydrate metabolism. *J. Dairy Sci.* **74**, 124 (1991)
91. Sinha R.P.: Toxicity of organic acids for repair – deficient strain of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1364–1366 (1986)
92. Skaugen, M., Abildgaard C.I., Nes I.F.: Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin S. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 674–686 (1997)
93. Smiley M.B., Fryder V.: Plasmids, lactic acid production, and N-acetyl-D-glucosamine fermentation in *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 777–781 (1978)
94. Spicher G., Lönner C.: Die Mikroflora des Sauerteiges XXI. die in Sauerteigen schwedischer Bäckereien vorkommenden Lactobacillen. *Zu Lebensm. unters. Forsch.* **181**, 9–13 (1985)
95. Stiles M.E., Holzapfel W.H.: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**, 1–29 (1997)
96. Tahara T., Oshimura M., Umezawa C., Kanatani K.: Isolation, partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 892–897 (1996)
97. Uguen P., Le Pennec J.P., Dufour A.: Lantibiotic Biosynthesis: Interactions between Prelactacin 481 and Its Putative Modification Enzyme, LctM. *J. Bacteriol.* **182**, 5262–5266 (2000)
98. Van Kraaij C., de Vos W.M., Siezen R.J., Kuipers O.P.: Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and application. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 575–587 (1999)
99. Von Husby K.O., Nes I.F.: Changes in the plasmid profile of *Lactobacillus plantarum* obtained from commercial meat starter cultures. *J. Appl. Bacteriol.* **60**, 413–417 (1986)
100. Wang T.T., Lee B.H.: Plasmids in *Lactobacillus*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**, 227–272 (1997)
101. Włodarczyk M.: Plazmidy bakteryjne, w: red. J. Baj, Z. Markiewicz: *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2006, s. 366–368
102. Worobo R.W., van Belkum M.J., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C., Stiles M.E.: A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* **177**, 3143–149 (1995)



Karolina Karabin<sup>2</sup>, Emilia Chudzik<sup>2</sup>, Tomasz Dzieciatkowski<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

<sup>2</sup>Wydział Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 166, 02-786 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2009

1. Wstęp. 2. Koinfekcje alfaherpeswirusami u pacjentów z HIV/AIDS. 3. Zakażenia wirusami opryszczki u noworodków. Infekcje wirusem opryszczki u osób z poparzeniami. 5. Choroby spowodowane przez alfaherpeswirusy u pacjentów onkologicznych. 6. Zakażenia o etiologii *Alphaherpesvirinae* u osób po przeszczepach. 7. Diagnostyka. 8. Leczenie zakażeń spowodowanych przez alfaherpeswirusy. 9. Podsumowanie

#### Alphaherpesviral infections in patients with immunological disorders

**Abstract:** Human herpesviruses types 1, 2 and 3 are unique members of the *Alphaherpesviridae* subfamily, as they can infect both skin and nerves and develop latent infection within the dorsal root and trigeminal ganglia. Infection with these viruses is common and causes a wide range of clinical syndromes. Although these viruses infect healthy children and adults, disease is more severe and extensive in the immunocompromised individuals. The diagnosis of common herpetic infection can usually be based upon the clinical history and presenting features. Confirmatory laboratory diagnosis is, however, required when patients are, or may be, immunocompromised. In recent years, the availability of diagnostic tests, mainly based on molecular biology techniques, has increased our understanding of this group of viruses.

1. Introduction. 2. Co-infections between alphaherpesviruses and patients with HIV/AIDS. 3. Neonatal herpes simplex diseases. 4. Herpes simplex infections in burn wounds. 5. Alphaherpesviral infections in cancer patients. 6. Infections with alphaherpesviruses in transplant recipients. 7. Diagnostics proceedings. 8. Therapy and management of alphaherpesviral diseases. 9. Summary

**Słowa kluczowe:** herpeswirusy, zakażenie, immunosupresja

**Key words:** alphaherpesviruses, infection, immunosuppression

## 1. Wstęp

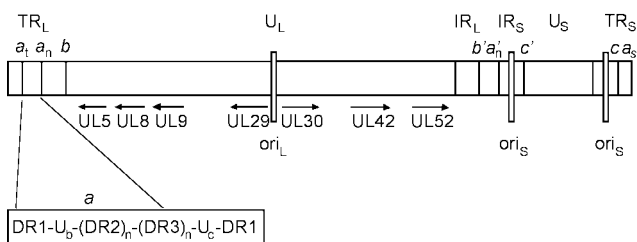
Herpeswirusy należą do najbardziej rozpowszechnionych DNA-wirusów w świecie kręgowców. Pierwsze doniesienia o pęcherzykowej wysypce pochodzą już ze starożytności, kiedy to Hipokrates nazwał tę zmiany „herpes” (z gr. „pełzać”), skąd wzięła się nazwa całej rodziny wirusów: *Herpesviridae* [57], jednak prawidłową etiologię choroby określono później, bowiem dopiero w 1919 roku [44]. *Herpesviridae* są zazwyczaj bardzo dobrze zaadaptowane do swoich gospodarzy, często powodując zakażenia układowe z objawami klinicznymi o różnym stopniu nasilenia. O zaliczeniu w skład poszczególnych podrodzin (alfa-, beta- i gammaherpeswirusów) decydują wstępnie biologiczne cechy konkretnego wirusa [11, 43]. Ostatecznym kryterium pozostają jednak jego właściwości molekularne, a zwłaszcza wzajemne podobieństwo sekwencji DNA oraz pokrewieństwo ważnych białek wirusowych (glikoprotein B, C, H oraz głównego białka kapsydu) [11].

W skład podrodziny *Alphaherpesvirinae* wchodzi trzy wirusy stanowiące naturalne patogeny człowieka: wirus opryszczki (HHV-1 i HHV-2, określane zwy-

czajowo jako HSV-1 i HSV-2) oraz wirus ospy wietrznej/półpaśca (HHV-3, znany powszechnie jako VZV) [11]. Przedstawiciele podrodziny charakteryzują się szerokim zakresem gospodarzy i względnie krótkim – w odniesieniu do innych herpeswirusów – czasem replikacji, bowiem podczas namnażania *in vitro* efekt cytotatyczny powodowany przez HHV-1 i HHV-2 pojawia się w czasie krótszym niż 48 h [10, 13]. Wirus ospy wietrznej i półpaśca powoduje zauważalny efekt cytotatyczny po nieco dłuższym okresie od zakażenia hodowli komórkowej. Po wstępnym namnożeniu w komórkach nabłonka wirusy z tej podrodziny ustalają stan latencji w komórkach układu nerwowego i/lub w limfocytach [43].

Zazwyczaj zmiany skórne powodowane przez wirusa opryszczki typu 1 umiejscowione są w obrębie skóry twarzy i błony śluzowej jamy ustnej (*herpes labialis*). Odmienna lokalizacja zakażeń spowodowanych przez HHV-1 występuje w przypadkach zanokcicy herpesowa (*herpetic whitlow*), *herpes gladiatorum*, opryszczkowego zapalenia mózgu (*herpetic encephalitis*), *herpetic keratitis*, *eczema herpeticum* [8]. HHV-1 może również powodować zmiany w obrębie narządów płciowych [3].

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel. 22 599 17 78; e-mail: dzieciatkowski@wp.pl



Rys. 1. Struktura genomu HHV-1. Na schemacie przedstawiono m.in. lokalizację siedmiu istotnych genów oraz trzy miejsca *ori* wirusa [wg. 32]

Wirus opryszczki typu 2 zajmuje głównie okolice skóry i błony śluzowej narządów płciowych (*herpes genitalis*), a także okolice odbytu [8]. HHV-2 poprzez uszkodzenia komórek nabłonka i redukcję bariery epitelialnej może się znacząco ułatwiać transmisję HIV, a także innych chorób przenoszonych drogą płciową [46]. Stanowi on też poważne zagrożenie dla noworodków, których matki mogą je zarazić podczas porodu [13, 34].

Wirus ospy wietrznej/półpaśca przy zakażeniu pierwotnym powoduje chorobę znaną powszechnie jako ospa wietrzna (*varicella*), która charakteryzuje się grudkowatymi krostkami zamieniającymi się z czasem w pęcherzykowe wykwity [14]. Następnie wirus przechodzi w stan latencji do zwojów nerwów czuciowych rdzenia kręgowego. Po pewnym czasie może ulegać reaktywacji powodując półpasiec (*zoster*). Taka reaktywacja jest o wiele rzadsza niż w przypadku opryszczki [10, 13].

Genom herpeswirusów stanowi liniowy dsDNA o skomplikowanej strukturze przestrzennej. Składa się on z unikalnych długich i krótkich regionów, w których występują sekwencje powtarzające się. Może w nich dochodzić do inwersji, co prowadzi do powstawania form izomerycznych (w przypadku HHV-1 są to 4 formy izomeryczne). Genom koduje takie białka jak polimeraza DNA, helikaza, prymaza i RNaza H [32].

Ciekawym zagadnieniem związanym z herpeswirusami jest ich możliwość przechodzenia w stan latencji. Niestety obecnie nie wiemy zbyt wiele na temat tego zjawiska [32]. Wiadomo, że w trakcie latencji ekspresji ulegają geny kodujące LAT (*latency-associated transcripts*). Wykazano obecność dwóch fragmentów o długości 1800–2000 i 1200–1500 zasad, ulegających transkrypcji w odwrotnej orientacji z genu natychmiastowego wczesnego IE110 (ICP0) [45]. Wykazano również, że mają one właściwości anty-apoptotyczne, co może wyjaśniać przeżywanie komórek latentnie zainfekowanych [26].

W przypadku opryszczki jamy ustnej (*herpes labialis*) miejscem latencji jest nerw trójdzielny, natomiast w przebiegu zajęcia narządów płciowych (*genital herpes*) latencja ustala się w nerwach krzyżowych [39]. Nie stwierdzono integracji wirusowego DNA z materiałem genetycznym gospodarza. DNA wirusa przyjmuje formę kolistą i przebywa w jądrze komórki, aż do chwili reaktywacji. Za zjawisko latencji odpowiedzialne są określone geny, a działanie czynników reaktywacji powoduje bierny transport nukleokapsydów do komórek skóry [28, 31]. Reaktywacja nie jest więc reinfekcją, a wynikiem przejścia wirusa ze stanu uśpienia (latencji) do stadium proliferacji [31, 39].

Objawy występujące przy reaktywacji latentnego wirusa często nie występują ściśle w miejscu, w którym pojawiły się zmiany pierwotne. Dzieje się tak, ponieważ reaktywowany wirus może przemieszczać się do komórek nabłonka wzdłuż innej gałęzi nerwu [28, 31, 39].

Zakażenia alfaherpeswirusami są bardzo powszechne i szacuje się, że w populacji dorosłych osób około 80% posiada przeciwciała anty-HHV-1/2 [13] a aż 90% anty-HHV-3 [10]. Taki stan rzeczy jest spowodowany tym, że u pacjentów po przebyciu pierwotnej infekcji wirus zostaje przeniesiony do nerwów czuciowych grzbietowych lub zwoju nerwu trójdzielnego, gdzie pozostaje w stanie latencji i może ulegać ponownej reaktywacji [13]. Zakażenia alfaherpeswirusu

Tabela I  
Główne etapy cyklu latencja-reaktywacja alfaherpeswirusów [wg. 26]

<p><b>Ustanowienie stanu latencji:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Wejście genomu wirusa do zwojowych neuronów</li> <li>● WzmóŜona ekspresja genów i replikacja DNA (ostra infekcja)</li> <li>● Zanik ekspresji genów wirusowych</li> <li>● WzmóŜona ekspresja LAT</li> </ul>
<p><b>Podtrzymanie latencji:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Ekspresja LAT</li> <li>● Brak wzmóŜonej ekspresji genów związanymi z cyklem litycznym wirusa</li> <li>● Brak wzmóŜonej ekspresji genów związanymi z replikacją wirusowego DNA</li> </ul>
<p><b>Reaktywacja:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Zewnętrzna stymulacja (np. stres albo immunosupresja)</li> <li>● Infekcja produktywna (intensywna ekspresja genów wirusowych, replikacja DNA)</li> <li>● Przetrawianie latentnie zainfekowanych komórek?</li> <li>● Ekspresja LAT</li> </ul>

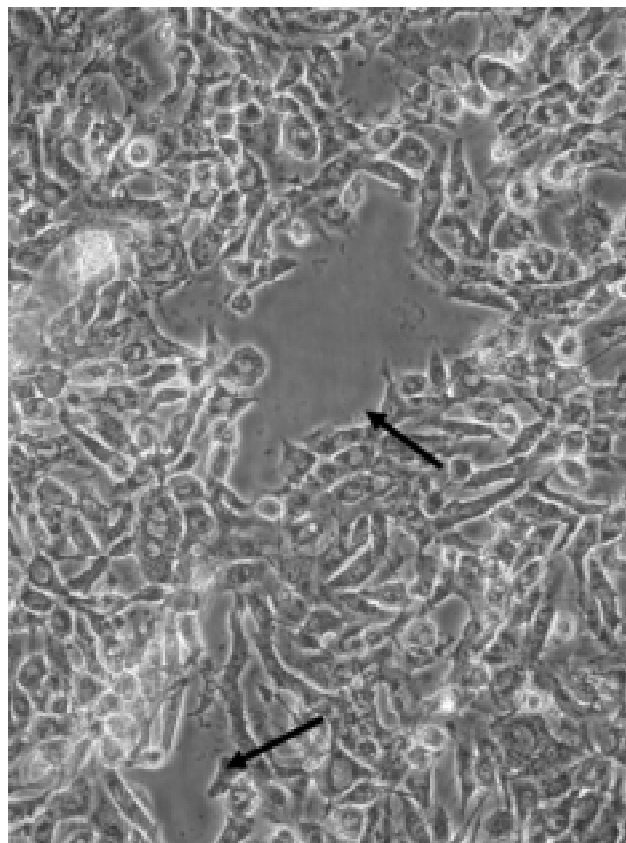
sami mogą manifestować się różnymi objawami i nasileniem [14]. Jednak są one najbardziej niebezpieczne dla osób z immunosupresją i mogą u nich powodować rozległe i nietypowe zakażenia, objawiające się zapaleniami przelyku, tchawicy, wątroby, nerek, rogówki czy jelita [8, 23]. Takie manifestacje mogą być bardziej agresywne i trwać dłużej, niż u osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym [17]. Do tej grupy zaliczamy osoby zakażone HIV, z oparzeniami, wrodzonymi niedoborami odporności, po przeszczepach, z nowotworami oraz noworodki.

## 2. Koinfekcje alfaherpeswirusami u pacjentów z HIV/AIDS

Współzakażenie wirusami należącymi do *Alpha-herpesvirinae* i HIV jest bardzo powszechne na całym świecie; szacuje się, że może on osiągać nawet 81–95% osób cierpiących na AIDS [1, 36]. Choroby przenoszone drogą płciową (STD – *sexually transmitted diseases*), w tym te powodowane przez wirusy opryszczki, stanowią poważny, dodatkowy czynnik ryzyka w transmisji HIV. Obecnie kładzie się duży nacisk na włączenie programu kontroli STD do programu zapobiegania rozprzestrzeniania HIV [36].

Wśród osób HIV-pozytywnych opryszczka genitalna należy do chorób najczęściej przenoszonych drogą płciową [46]. Głównym powodem takiego stanu rzeczy jest to, że HHV-2 (a także inne STD) manifestuje swoją obecność poprzez tworzenie wrzodowatych zmian na powierzchni narządów płciowych i ich okolicy, redukując tym samym barierę epitelialną [36, 46]. Taka sytuacja może zwiększyć ryzyko transmisji HIV nawet 5-krotnie [46]. Wykazano bowiem, że obecność HIV i HHV-2 u tego samego pacjenta może powodować wzajemną stymulację replikacji u obu wirusów i tym samym prowadzić do progresji choroby (zarówno AIDS, jak i powstawania wrzodowatych zmian) [36].

Podobnie groźne następstwa mogą mieć infekcje powodowane przez HHV-3. Zakażenia te różnią się znacznie u dorosłych i dzieci. Ma to związek z faktem, iż najczęściej dojrzały pacjenci chorowali na ospę wietrzną przed zakażeniem HIV. U dzieci natomiast jest wysokie ryzyko, że ospa wietrzna w związku z obniżoną odpornością, rozwinie się w półpasiec [19]. Prawdopodobieństwo choroby wzrasta wraz ze spadkiem liczby komórek CD4<sup>+</sup> obserwowanym w przebiegu AIDS. U ludzi z HIV obserwuje się trzy główne objawy związane z infekcją wirusem ospy wietrznej: zapalenie siatkówki; utrzymujące się uszkodzenia naskórka (prawdopodobnie poprzez reaktywacje wirusa); zapalenie mózgu. Objawy neurologiczne mogą mieć miejsce, bez typowych manifestacji skórnych, w skutek czego mogą być trudne do zdiagnozowania [19].



Rys. 2. Typowy efekt cytopatyczny wywołany przez herpeswirusa typu 1 (HHV-1) w hodowli komórkowej linii Vero. Strzałki wskazują komórki zniszczone działaniem wirusa. Powiększenie 400x [badania własne]

Zapalenie mózgu wywołane przez HHV-3 występuje w 0,1 do 4% pacjentów z AIDS z chorobami o podłożu neurologicznym i ma wysoką śmiertelność. U większości pacjentów z zakażonych HIV, obserwuje się na początku choroby skórne wykwity, następnie dopiero uszkodzenia OUN takie jak zapalenie mózgu, zapalenie rdzenia, czy zapalenie opon mózgowych. Następstwa wywołanymi uszkodzeniem OUN są: osłabiona świadomość, ból głowy, napady, zmiany w psychice [52].

U pacjentów zakażonych HIV półpasiec oczny występuje częściej niż u przedstawicieli immunokompetentnych, a zmiany miejscowe są rozleglejsze, bardziej bolesne, okres gojenia ulega wydłużeniu, mogą również pojawiać się nowe wykwity. W tej grupie poważnym zagrożeniem dla wzroku jest ostra martwica siatkówki, rogówki, naczyńki oraz zapalenie nerwu wzrokowego [20]. Zapalenie siatkówki obserwowane jest jako powikłanie *zoster ophthalmicus*, a także półpasca, obejmującego odległe dermatomy. Co więcej, w ponad połowie przypadków zajęta jest siatkówka obu gałek ocznych, co sugeruje zakażenie układu nerwowego drogą krwi i następujące potem rozprzestrzenienie zakażenia wzdłuż nerwów wzrokowych [40]. Zapalenie siatkówki przebiega pod postacią wielogniskowych

zmian martwiczych, obejmujących początkowo jej zewnętrzne obszary. Zmiany postępują dośrodkowo, bez nasilonego stanu zapalnego w obrębie gałki ocznej [16]. U chorych na AIDS choroba postępuje szybko, prowadząc do ślepoty w 75–85% przypadków [40].

Charakterystyczną właściwością półpaśca u ludzi zakażonych HIV jest skłonność do częstych nawrotów. U 20–30% pacjentów, którzy przebyli półpaśca, pojawia się on powtórnie, obejmując ten sam lub inne dermatomy [18]. Należy również do chorób wskaźnikowych, stąd w przypadku wystąpienia reaktywacji wirusa HHV-3 w postaci półpaśca u osób poniżej 50 roku życia należy wykonać badania serologiczne w kierunku zakażenia wirusem HIV [20].

### 3. Zakażenia wirusami opryszczki u noworodków

Zakażenia wirusem opryszczki u noworodków mogą mieć poważne w skutkach konsekwencje jak np. uszkodzenia mózgu, czy nawet śmierć dziecka [3, 24, 27]. Szacuje się, że do zakażeń opryszczkowych dochodzi od 1:1400 do 1:30000 przypadków żywych urodzeń [3].

HHV-2 jest odpowiedzialny za 75% zakażeń noworodków, co jest szczególnie niebezpieczne, ponieważ według światowego piśmiennictwa reaktywacja opryszczki genitalnej powodowana przez typ 2 jest częstsza niż przez typ 1 wirusa [3].

Do transmisji wirusa matka – dziecko może dojść kilkoma sposobami. Największy procent stanowią zakażenia okołoporodowe (85%), następnie zakażenia poporodowe (10%) i zakażenia drogą maciczną (5%) [27]. Choroby wywołane przez wirusy opryszczki u noworodków możemy zaklasyfikować w trzy grupy: SEM (*skin, eyes and/or mouth disease*), około 45% przypadków, nie leczone może powodować poważne uszkodzenia neurologiczne; CNS (*central nervous system disease*), około 30% przypadków, należą tu takie schorzenia jak zapalenie mózgu i zapalenie opon mózgowych; rozsiane infekcje (*disseminated diseases*), w trakcie, których może dojść do zajęcia wielu organów takich jak płuca, nerki, skóra, stanowią one około 25% przypadków [24, 27].

Istnieje kilka czynników, które mogą zwiększać ryzyko transmisji wirusa z matki na dziecko. Należą do nich m. in.: typ zakażenia matki (pierwotny lub nawrotowy), ciągłość błony śluzowej, sposób porodu (cesarskie cięcie lub poród pochwowy) [27].

Noworodki matek, które przed terminem porodu doznały pierwotnego zakażenia wirusami opryszczki są bardziej narażone na infekcje, niż matki, u których opryszczka genitalna miała charakter nawrotowy [27]. Pierwotne zakażenie matki może być nawet śmiertelne dla płodu [3]. Również rodzaj porodu nie jest obojętny,

dzieci które rodzą się przez cesarskie cięcie są mniej narażone na infekcje wirusem opryszczki, ponieważ w trakcie porodu nie mają styczności z wrzodowatymi zmianami matki [27].

W ciągu ostatnich 30 lat dokonał się olbrzymi postęp w diagnostyce i leczeniu chorób u noworodków na tle opryszczkowym [27]. Jest to niezmiernie istotne, ponieważ w 70% przypadkach noworodków zakażonych HHV-1 lub HHV-2, ich matki nie miały typowych objawów opryszczki genitalnej [3].

### 4. Infekcje wirusem opryszczki u osób z poparzeniami

Rozległe lub głębokie oparzenia mogą implikować stan immunosupresji, czego konsekwencją są częste zakażenia oportunistyczne o charakterze bakteryjnym, wirusowym i grzybiczym. Immunosupresja spowodowana przez oparzenia jest indukowana poprzez utratę ciągłości skóry i błon śluzowych; jednocześnie ważną rolę w tym procesie pełnią limfocyty T supresorowe [37].

Zakażenia wirusem opryszczki są powszechne u osób z poparzeniami i mogą być wynikiem pierwotnego zakażenia wirusem, bądź jego reaktywacją [7]. U takich osób wirus może manifestować swoją obecność występowaniem pęcherzykowatych zmian na skórze, szczególnie w okolicy uszkodzeń. Poza tym często u takich pacjentów obserwuje się opryszczkowe zapalenie tchawicy, oskrzeli lub płuc. Niezwykle niebezpieczne są systemowe zakażenia opryszczkowe, które mogą być źródłem poważnych komplikacji [48].

W leczeniu zakażeń alfa herpeswirusami u osób po oparzeniach zaleca się stosowanie szybkiej i agresywnej terapii przeciwwirusowej z użyciem acyklowiru jako leku pierwszego rzutu [37, 48].

### 5. Choroby spowodowane przez alfa herpeswirusy u pacjentów onkologicznych

U osób z chorobami nowotworowymi obserwujemy wiele dysfunkcji, które mogą być przyczyną zwiększonego ryzyka ataku ze strony mikroorganizmów, należą do nich m.in.: przerwanie ciągłości skóry i błon śluzowych, dysfunkcja neutrofilii, osłabienie, jak również upośledzenia odpowiedzi immunologicznej związanej z limfocytami T spowodowane chemioterapią [41]. Zmiany powodowane przez przedstawicieli *Alphaherpesvirinae* u pacjentów onkologicznych mają często postać atypową, podobnie jak u innych osób z immunosupresją [33].

Infekcje centralnego układu nerwowego (CNS), którego czynnikiem etiologicznym może być wirus opryszczki, są nadal ważną przyczyną zachorowań

ności i śmiertelności u pacjentów z nowotworami. Najbardziej narażone są osoby z białaczkami, chłoniakami i pierwotnymi guzami mózgu [41]. U takich pacjentów obserwujemy również inne zespoły chorobowe spowodowane przez HHV-1 czy HHV-2 w tym zapalenie płuc, przełyku, *eczema herpeticum* [33, 58].

Pacjenci chorzy na nowotwory są szczególnie narażeni na wtórne infekcje wirusem ospy wietrznej/półpaśca. Choroba ta jest szczególnie groźna dla dzieci z zaawansowaną białaczką. Może doprowadzić do zapalenia płuc i przełyku, które występuje u jednego na trzech pacjentów. W niektórych przypadkach pierwotne zakażenia HHV-3 u dzieci z chorobą nowotworową prowadziły do zejścia śmiertelnego. Wirus ten jest również niebezpieczny dla ludzi z chłoniakami. Leczenie takich pacjentów odbywa się w podobny sposób jak innych osób z osłabionym układem odpornościowym [42].

## 6. Zakażenia o etiologii *Alphaherpesvirinae* u osób po przeszczepach

Wirusy opryszczki są zazwyczaj pierwszymi herpeswirusami, które reaktywują się u około 25–40% biorców przeszczepu, zazwyczaj pomiędzy 2–4 tygodniem po transplantacji [29, 49]. Uogólnione zakażenie o etiologii HHV-1 lub HHV-2 u pacjentów poddanych immunosupresji jest zazwyczaj śmiertelne pomimo zastosowanej terapii przeciwwirusowej [22, 25].

Podawanie leków immunosupresyjnych prowadzi do zaburzenia szlaków sygnalizacji komórkowej oraz normalnych funkcji komórek efektorowych układu odpornościowego, odpowiedzialnych za obronę ustroju przed zakażeniami wirusowymi [38]. Intensywność immunosupresji oraz rodzaj podawanych leków immunosupresyjnych są czynnikami bezpośrednio związanymi z częstością reaktywacji alfa herpeswirusów oraz przebiegiem zakażeń. Objawowe zakażenia HHV-1 oraz HHV-2 obserwuje się u znacznego odsetka chorych przyjmujących leki immunosupresyjne, a ich częstość określa się na podstawie obserwacji na 53% (pacjenci przyjmujący OKT3), 18% (pacjenci przyjmujący globulinę antytymocytową). Zwiększone ryzyko obserwuje się także u pacjentów, którym podaje się cyklosporynę A, mykofenolan mofetylu, azatioprin, sirolimus i takrolimus (w tych grupach obserwowana częstość zakażeń opryszczkowych wynosi 9,7–22,8%) [38].

Kolejnym czynnikiem mającym związek z częstością i przebiegiem zakażeń wywoływanych przez herpeswirusy u biorców przeszczepów jest status serologiczny w okresie okołoprzeszczepowym. Obecność przeciwciał przeciwko alfa herpeswirusom jest czynnikiem bezpośrednio związanym z ryzykiem wystąpienia zakażenia w okresie po przeszczepieniu, gdyż więk-

szość zakażeń u biorców przeszczepów wynika z reaktywacji wirusa latentnego. W grupie serododatnich biorców komórek krwiotwórczych ryzyko wystąpienia objawowego zakażenia wywołanego przez wirusy opryszczki ocenia się na 20–30%. Odsetek ten jest zbliżony do wyników obserwacji u biorców szpiku kostnego (21–43%) [53]. W grupie biorców przeszczepów wątroby, około 50% obserwowanych zakażeń opryszczkowych ma miejsce w ciągu trzech tygodni po transplantacji. Pierwsze objawy zakażenia, czyli wystąpienie zmian skórnych, pojawiają się w tej grupie średnio po 22 dniach od zabiegu. Objawy wskazujące na zakażenie uogólnione oraz na zajęcie narządów wewnętrznych z reguły pojawiają się w ciągu pierwszych kilku tygodni po transplantacji. Objawy zapalenia płuc u biorców przeszczepów pojawiają się z reguły w późniejszym okresie: 1–2 miesiące po transplantacji. Opisywane są także przypadki zapalenia wątroby o podłożu HHV-1 lub HHV-2 obserwowane w późnym okresie posttransplantacyjnym (60–460 dni po zabiegu) [12]. Czynnikiem ryzyka w szczególnym stopniu usposabiającymi do reaktywacji latentnego wirusa i wynikających stąd zakażeń objawowych są: wiek (>40 r.ż.), stosowane przed transplantacją nasświetlania izotopowe, ostra lub przewlekła choroba „przeszczep przeciwko gospodarzowi” (*Graft versus Host Disease* – GvHD), diagnoza inna niż przewlekła białaczka szpikowa oraz głęboka immunosupresja [53].

U biorców organów obserwuje się wiele schorzeń charakterystycznych dla osób z upośledzoną funkcją układu odpornościowego, takich jak opryszczkowe zapalenie mózgu, opryszczkowe zapalenie płuc, które pojawia się najczęściej po przeszczepach serca i płuc [9, 29]. Do powstania tego ostatniego może dojść w wyniku endogennej reaktywacji wirusa nabytego wraz z organem dawcy, bądź poprzez wprowadzenie wirusa wraz z wydzieliną gardłową na niższe poziomy dróg oddechowych podczas intubacji pacjenta [9]. Kremer i współpracownicy wykazali, że dość częstym powikłaniem po przeszczepie nerki jest opryszczkowe zapalenie rogówki [30]. Wirus opryszczki może również być przyczyną rzadkiego zapalenia wątroby [12].

Prawdopodobieństwo wystąpienia objawowego zakażenia HHV-3 u biorców przeszczepów jest 10- do 100-krotnie większe w populacji biorców przeszczepów (1–12%) w porównaniu do populacji ludzi zdrowych (1,5–3 przypadki/1000) [38]. Śmiertelność w wyniku reaktywacji latentnego wirusa ospy wietrznej/półpaśca u biorców szpiku i komórek krwiotwórczych szacowana jest na poziomie 7%. Dotyczy to zakażeń, w których zmiany skórne są dominującym bądź jedynym objawem klinicznym. W przypadkach, w których obserwuje się objawy zakażenia ogólnoustrojowego lub narządowego, śmiertelność w wyniku reaktywacji wirusa wzrasta wielokrotnie, osiągając nawet 55% [2, 38].

Reaktywacja HHV-3 występuje w 30–60% seropozytywnych biorców przeszczepów, z czego większa część już 3 miesiące po operacji [5]. Pierwotne zakażenia wirusem ospy wietrznej/półpaśca są obserwowane znacznie rzadziej [55]. Główną przyczyną zgonów w przebiegu zakażenia HHV-3 jest zapalenie płuc, a zakażeniem najgorzej rokującym i obciążonym najwyższym ryzykiem zejścia śmiertelnego jest jednocześnie zajęcie dolnych dróg oddechowych i ośrodkowego układu nerwowego [51]. Zapalenie wątroby wywołane przez HHV-3 może mieć nietypowe objawy, co może opóźnić diagnozę. [55].

Pojawienie się objawów zakażenia tym wirusem u biorców narządów unaczynionych ma miejsce znacznie później w porównaniu z herpeswirusem typu 5 (HHV-5, CMV) lub wirusami opryszczki i waha się od 100 do ponad 500 dni po transplantacji, dotycząc od 5 do 12% pacjentów. Mimo, że przypadki takie występują znacznie rzadziej, reaktywację wirusa ospy wietrznej/półpaśca obserwuje się także we wczesnym okresie poprzyszczepowym [2]. Objawy rozsiane będące wynikiem zakażenia pierwotnego pacjentów wrażliwych, wystąpić mogą w dowolnym okresie. U biorców komórek krwiotwórczych pochodzących od dawców niespokrewnionych, częstość występowania zakażeń objawowych powodowanych przez HHV-3 jest znacznie wyższa w odniesieniu do analogicznego ryzyka reaktywacji wirusa u biorców narządów unaczynionych. Badania biorców szpiku kostnego wykazały, że ryzyko wystąpienia objawowego zakażenia wynosi 63%. W przypadku biorców komórek krwiotwórczych krwi obwodowej, prawdopodobieństwo to oceniane jest na 37%, jednak, gdy chorobą kwalifikującą do przeszczepu były zaburzenia limfoproliferacyjne, częstość reaktywacji sięgała 72% [2]. Ryzyko wystąpienia zakażeń o cięższym przebiegu jest niższe. Czynnikiem ryzyka w szczególnym stopniu usposabiającymi do reaktywacji latentnego wirusa i wynikających stąd zakażeń objawowych są: wiek (>40 r.ż.), stosowane przed transplantacją napromienianie, wystąpienie GvHD, diagnoza inna niż przewlekła białaczka szpikowa oraz głęboka immunosupresja [2, 51].

## 7. Diagnostyka

Obecnie istnieje wiele metod wykrywania zakażeń alfaherpeswirusowych; należą do nich zarówno metody serologiczne, jak i metody biologii molekularnej. Do najczęściej stosowanych metod serologicznych należą testy ELISA, za pomocą których wykrywa się przeciwciała w klasach IgG i IgM. Metody te sprawdzają się zarówno do wykrywania wirusa opryszczki, jak i półpaśca. W obu przypadkach większe znaczenie

diagnostyczne mają przeciwciała klasy IgM, jako markery świeżego zakażenia [14].

Wśród metod biologii molekularnej najczęściej stosowana jest reakcja łańcuchowej polimeryzacji (PCR). Coraz częściej konwencjonalny PCR jest wypierany przez real-time PCR, który jest o wiele czulszy i szybszy; dodatkowo też pozwala określić ilość kopii wirusa w badanej próbce [14, 54]. W diagnostyce zakażeń wirusem ospy wietrznej/półpaśca sporadycznie stosuje się także takie metody, jak hybrydyzacja *Southern* i *Northern* [14].

Oba wirusy można namnażać w hodowlach komórkowych, gdzie po określonym czasie obserwuje się efekt cytopatyczny (HHV-1 oraz HHV-2 – 1–7 dni, HHV-3 – 3–14 dni). Jednak w przypadku infekcji spowodowanych przez wirusa ospy wietrznej/półpaśca odchodzi się od zakażenia nim hodowli komórkowych, ponieważ wirus namnaża się w nich niechętnie, a czas oczekiwania na efekt cytopatyczny jest zbyt długi [14].

## 8. Leczenie zakażeń spowodowanych przez alfaherpeswirusy

Najczęściej stosowanym lekiem w terapii zakażeń o etiologii *Alphaherpesvirinae* jest acyklowir – pochodna deoksyguanozyny o zmodyfikowanej reszcie cukrowej, gdzie w miejsce cyklicznej deoksyrybozy wprowadzono niecykliczny łańcuch boczny [15]. Stosowany jest on do leczenia ciężkich zakażeń opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu wywołanych przez alfaherpeswirusy, opryszczki noworodków, a także w zakażeniach narządu wzroku, skóry i błon śluzowych. Również w terapii pierwotnej i nawrotowej infekcji narządów płciowych o etiologii HHV-1 i HHV-2, a także do leczenia zakażeń narządowych i układowych. Podstawowym warunkiem skuteczności terapii jest wczesne podanie leku, najkorzystniej w pierwszej lub drugiej dobie od pojawienia się pierwszych objawów, a także zastosowanie odpowiednio wysokiej dawki terapeutycznej [47].

Prawdopodobieństwo wystąpienia infekcji wywołanej opornym szczepem wirusa opryszczki powinno być brane pod uwagę, jeśli po 5–7 dniach terapii brak jest pozytywnych efektów leczenia lub po 3–4 dniach powstają nowe, satelitarne ogniska zakażenia [4]. Szczepy wirusa odporne na acyklowir mogą wykazywać również brak wrażliwości na inne leki o podobnej budowie takie jak: walacyklowir, famcyklowir i penicyklowir [4, 35]. Mechanizm oporności wiąże się najczęściej z obecnością punktowej mutacji w obrębie genu kinazy tymidynowej [50]. Rzadziej przyczyną zmiany w profilu wrażliwości jest mutacja w obrębie genu kodującego polimerazę DNA [21]. Może ona

wywołać krzyżową oporność na foskarnet, gancyklowir i cidofovir – leki używane alternatywnie w leczeniu zakażeń alfa herpeswirusowych [4].

U pacjentów immunokompetentnych oporność wirusów opryszczki na acyklowir nie stanowi obecnie większego problemu terapeutycznego, ponieważ szczepy odporne w tej grupie stanowią niespełna 1% izolatów. Brak również doniesień mówiących, że ich ilość zwiększa się w efekcie ekspozycji na lek [56]. U pacjentów z obniżoną wydolnością układu immunologicznego około 3–30% (w zależności od przyczyny immunosupresji) izolowanych szczepów wirusa wykazuje oporność na acyklowir [6]. Poważniejsze wyzwanie dla lekarzy i naukowców stanowi terapia osób zakażonych HHV-3 i HIV, ponieważ koinfekcja zwiększa prawdopodobieństwo powstania mutantów opornych na analogii nukleozydów, szczególnie acyklowiru [1]. Leki takie jak: famcyklowir czy walacyklowir, działające u ludzi z naturalną odpornością, nie były sprawdzane w grupie pacjentów z niedoborami immunologicznymi [19].

## 9. Podsumowanie

Zakażenia powodowane przez alfa herpeswirusy mogą manifestować się różnymi objawami i nasileniem. W przypadku osób, których układ immunologiczny funkcjonuje prawidłowo zakażenia takie mogą powodować niegroźne pęcherzykowate zmiany na powierzchni skóry i błon śluzowych, które z czasem mijają. Sytuacja ma się całkiem inaczej u osób, u których występuje stan immunosupresji. W grupie takich pacjentów objawy mogą mieć charakter bardziej nasilony i przewlekły, a nawet zagrażać życiu.

Wirusy te mogą być przyczyną niezwykle niebezpiecznych schorzeń takich jak zapalenie mózgu, opon mózgowych, czy płuc. Często objawy związane z nimi są nietypowe i trudno jednoznacznie stwierdzić, że czynnikiem etiologicznym są właśnie wirusy opryszczki typu 1 i 2, czy wirusa ospy wietrznej/półpaśca. Dlatego bardzo ważne jest stosowanie czułych metod diagnostycznych mogących jednoznacznie potwierdzić obecność wirusa. Odnosi się to szczególnie do diagnostyki opryszczkowego zapalenia mózgu, gdzie wirus rzadko jest obecny w płynie rdzeniowo-mózgowym [59].

Obecnie wyzwanie dla naukowców stanowi opracowanie skutecznych metod leczenia skierowanych przeciwko *Alphaherpesvirinae*, ponieważ coraz częściej wśród tych wirusów pojawiają się szczepy odporne na analogii nukleozydów np. acyklowir. Dodatkowym problemem terapeutycznym jest fakt, iż leki te nie działają na wirusa w formie latentnej [59].

## Piśmiennictwo

1. Aoki F.Y.: Management of genital herpes in HIV-infected patients. *Herpes*, **8**, 41–45 (2001)
2. Arvin A.M.: Varicella-zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol. Blood Marrow Transpl.* **6**, 219–230 (2000)
3. Avgil M., Ornoy A.: Herpes simplex and Epstein-Barr virus infections in pregnancy: consequences of neonatal or intra-uterine infections. *Reprod. Toxicol.* **21**, 436–445 (2006)
4. Bacon H.T., Levin J.M., Leary J.J., Starisky T.R., Sutton D.: Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 114–128 (2003)
5. Boeckh M., Hutchinson F.: Prevention of VZV infection in immunosuppressed patients using antiviral agents. *Herpes*, **13**, 60–65 (2006)
6. Boivin G., Erice A., Crane D.D., Balfour H.H.: Acyclovir susceptibilities of herpes simplex virus strains isolated from solid organ transplant recipients after acyclovir or ganciclovir prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 357–359 (1993)
7. Church D., Elsayed S., Reid O., Winston B., Lindsay R.: Burn wound infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 403–434 (2006)
8. Cieśluk B., Majewska A.: Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1): epidemiologia i kliniczne postacie nietypowych zakażeń. *Zakażenia*, zesz.1, 71–72 (2006)
9. Cunhan B. A., Eisenstein L. E., Dillard T., Krol V.: Herpes simplex virus (HSV) pneumonia in a heart transplant: diagnosis and therapy. *Heart Lung*, **36**, 72–78 (2007)
10. Cunningham A.L., Breuer J., Dwyer D.E., Gronow D.W., Helme R.D., Litt J.C., Levin M.J., MacIntyre C.R.: The prevention and management of herpes zoster. *Med. J. Aust.* **188**, 171–176 (2008).
11. Davison A., Eberle R., Hayward G.S.: Herpesviruses, (w) Virus taxonomy – classification and nomenclature of viruses. VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Red. C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, Elsevier Academic Press, San Diego 2005, s. 193–212.
12. Ducro A.N., Sha B.E., Jakate S., Hayden M.K., Simon D.M., Saltzberg S.N., Arai S., Kessler H.A.: Herpes simplex virus hepatitis: expanding the spectrum of disease. *Transpl. Infect. Dis.* **8**, 171–176 (2006)
13. Dwyer D.E., Cunningham A.L.: Herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *Med. J. Aust.* **177**, 267–273 (2002)
14. Dzieciatkowski T., Majewska A., Krawczyk E., Łuczak M.: Postacie kliniczne i diagnostyka herpeswirusowych zakażeń skóry. *Przegl. Dermat.* **2**, 195–200 (2007)
15. Elion G.B.: The chemotherapeutic exploitation of virus-specified enzymes. *Adv. Enzym. Regul.* **18**, 53–66 (1980)
16. Engstrom R.E. Jr, Holland G.N., Margolis T.P., Muccioli C., Lindley J.I., Belfort R. Jr, Holland S.P., Johnston W.H., Wolitz R.A., Kreiger A.E.: The progressive outer retinal necrosis syndrome. A variant of necrotizing herpetic retinopathy in patients with AIDS. *Ophthalmology*, **101**, 1488–1502 (1994)
17. Erlich K. S.: Management of herpes simplex and varicella zoster virus infections. *West J. Med.* **166**, 211–215 (1997)
18. Gnann J.W.: Varicella-zoster virus: atypical presentations and unusual complications. *J. Infect. Dis.* **186**, 91–98 (2002)
19. Gershon A.: Prevention and treatment of VZV infections in patients with HIV. *Herpes*, **8**, 32–36 (2001)
20. Gross G., Schöfer H., Wassilew S., Friese K., Timm A., Guthoff R., Pau H.W., Malin J.P., Wutzler P., Doerr H.W.:

- Herpes zoster guideline of the German Dermatology Society (DDG). *J. Clin. Virol.* **26**, 277–289 (2003)
21. Harris W., Collins P., Fenton R.J., Snowden W., Sowa M., Darby G.: Phenotypic and genotypic characterization of clinical isolates of herpes simplex virus resistant to aciclovir. *J. Gen. Virol.* **84**, 1393–1401 (2003)
  22. Herget G.W., Riede U.N., Schmitt-Gräff A., Lübbert M., Neumann-Haefelin D., Köhler G.: Generalized herpes simplex virus infection in immunocompromised patient – report of a case and review of the literature. *Pathol. Res. Pract.* **201**, 123–129 (2005)
  23. Hwang Y.S., Spruance S.L.: The epidemiology of uncommon herpes simplex virus type 1 infections. *Herpes*, **6**, 16–19 (1999)
  24. Jacobs R.F.: Neonatal herpes simplex virus infections. *Semin. Perinatol.* **22**, 64–71 (1998)
  25. Jenkins F.J., Rowe D.T., Rinaldo C.R.: Herpesvirus infections in organ transplant recipients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 1–7 (2003)
  26. Jones C.: Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus latency. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 79–95 (2003)
  27. Kimberlin D.W.: Neonatal herpes simplex infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 1–13 (2004)
  28. Koelle D.M., Corey L.: Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annu. Rev. Med.* **59**, 381–395 (2008)
  29. Kotton C. N., Fishman J. A.: Viral infection in the renal transplant recipient. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1–17 (2005)
  30. Kremer I., Wagner A., Shmuel D., Yussim A., Shapira Z.: Herpes simplex keratitis in renal transplant patients. *Br. J. Ophthalmol.* **75**, 94–96 (1991)
  31. Lachmann R.: Herpes simplex virus latency. *Expert Rev. Mol. Med.* **29**, 1–14 (2003)
  32. Lehman I.R., Boehmer P.E.: Replication of herpes simplex virus DNA. *J. Biol. Chem.* **274**, 28059–28062 (1999)
  33. Leming P.D., Martin S.E., Zwellinger L.A.: Atypical herpes simplex (HSV) infection in a patient with Hodgkin's disease. *Cancer*, **54**, 3043–3047 (1984)
  34. Majewska A., Krawczyk E., Łuczak M.: Opryszczka narządów płciowych (genital herpes) – obraz kliniczny i możliwe następstwa zakażeń. *Zakażenia*, zes. 5, 61–70 (2005)
  35. Majewska A., Łuczak M., Cieśluk B.: Standardy leczenia infekcji wywołanych przez herpes simplex virus (HSV) – terapia alternatywna i chemioprophylaktyka. *Zakażenia*, zes. 2, 79–83 (2006)
  36. Mbopi-Keou F.X., Robinson N.J., Mayaud P., Belec L.D., Brown W.G.: Herpes simplex virus type 2 and heterosexual spread of human immunodeficiency virus infection in developing countries: hypotheses and research priorities. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**, 161–171 (2002)
  37. McGill S.N., Cartotto R.C.: Herpes simplex virus infection in a paediatric burn patient: case report and review. *Burns*, **26**, 194–199 (2000)
  38. Miller G.G., Dummer J.S.: Herpes simplex and varicella zoster viruses: forgotten but not gone. *Am. J. Transpl.* **7**, 741–747 (2007)
  39. Mitchell B.M., Bloom D.C., Cohrs R.J., Gilden D.H., Kennedy P.G.: Herpes simplex virus-1 and varicella-zoster virus latency in ganglia. *J. Neurovirol.* **9**, 194–204 (2003)
  40. Ormerod L.D., Larkin J.A., Margo C.A., Pavan P.R., Menosky M.M., Haight D.O., Nadler J.P., Yangco B.G., Friedman S.M., Schwartz R., Sinnott J.T.: Rapidly progressive herpetic retinal necrosis: a blinding disease characteristic of advanced AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 34–45 (1998)
  41. Pruiitt A.A.: Nervous system infections in patients with cancer. *Neurol. Clin. N. Am.* **21**, 193–219 (2003)
  42. Reusser P.: Management of viral infections in immunocompromised cancer patients *Swiss Med. Wkly.* **132**, 374–378 (2002)
  43. Roizmann B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C., Studdert M.J.: The Family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* **123**, 425–449 (1992)
  44. Roizman B., Whitley R.J.: The nine ages of herpes simplex. *Herpes*, **8**, 273–279 (2001)
  45. Rock D.L., Nesburn A.B., Ghiasi H., Ong J., Lewis T.L., Lockensgard J.R., Wechsler S.L.: Detection of latency-related viral RNA in trigeminal ganglia of rabbits infected with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **61**, 3820–3826 (1987)
  46. Severson J.L., Tyring S.K.: Relation between herpes simplex viruses and human immunodeficiency virus infections. *Arch. Dermatol.* **135**, 1393–1397 (1999)
  47. Schaeffer H.J., Beauchamp L., de Miranda P., Elion G.B., Bauer D., Collins J.P.: 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature*, **272**, 583–585 (1978)
  48. Sheridan R.L., Schulz J.T., Weber J.M., Ryan C.M., Pasternack M.S., Tompkins R.G.: Cutaneous herpetic infections complicating burns. *Burns*, **26**, 621–624 (2000)
  49. Singh N.: Infections in solid-organ transplant. *Am. J. Infect. Control.* **25**, 409–417 (1997)
  50. Suzutani T., Ishioka K., De Clercq E., Ishibashi K., Kaneko H., Kira T., Hashimoto K., Ogasawara M., Ohtani K., Wakamiya N., Saijo M.: Differential mutation patterns in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 clones passaged in the presence of acyclovir or penciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1707–1713 (2003)
  51. Tauro S., Toh V., Osman H., Mahendra P.: Varicella zoster meningoencephalitis following treatment for dermatomal zoster in an alloBMT patient. *Bone Marrow Transplant.* **26**, 795–796 (2000)
  52. Toledo P.V., Pellegrino L.N., Cunha C.A.: Varicella-zoster virus encephalitis in an AIDS patient. *Braz. J. Infect. Dis.* **8**, 255–258 (2004)
  53. Tomonari A., Iseki T., Takahashi S., Ooi J., Takasugi K., Shimohakamada Y., Ohno N., Nagamura F., Uchimaruru K., Tani K., Tojo A., Asano S.: Varicella-zoster virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Br. J. Haematol.* **122**, 802–805 (2003)
  54. Weidmann M., Meyer-König U., Hubert F. T.: Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1565–1568 (2003)
  55. Weisdorf D.: Varicella zoster infection after bone marrow transplantation: incidence risk factors and complications. *Bone Marrow Transplant.* **13**, 277–283 (1994)
  56. Wolf R., Wolf D., Orion E., Matz H.: Long-term prophylactic antiviral therapy for recurrent herpes simplex: the controversy goes on. *Clin. Dermat.* **21**, 164–167 (2003)
  57. Wood M. J.: History of varicella zoster virus. *Herpes*, **7**, 60–65 (2000)
  58. Wood M. J.: Viral infections in neutropenia-current problems and chemotherapeutic control. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 81–93 (1998)
  59. Zajkowska J.M., Hermanowska-Szpakowicz T., Pancewicz S.A., Kondrusik M., Grygorczuk S.: Opryszczkowe zapalenie mózgu: herpes simplex encephalitis. *Pol. Przegl. Neurol.* **2**, 22–26 (2006)



Krystyna I. Wolska\*<sup>1</sup>, Anna M. Grudniak<sup>1</sup>, Anna Kraczkiewicz-Dowjat<sup>1</sup>, Anna Kurek<sup>1</sup>

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

Wpłynęło w lutym 2010 r.

1. Wstęp. 2. Pigmenty jako czynniki wirulencji. 2.1. *Pseudomonas aeruginosa* i piocyjanina. 2.2. *Staphylococcus aureus* i stafyloksantyna. 2.3. Inne bakterie chorobotwórcze i ich pigmenty. 3. Funkcje pigmentów nie związane z chorobotwórczością. 3.1. Fotosynteza. 3.2. Pozyskiwanie żelaza. 3.3. Ochrona przed szkodliwym działaniem czynników środowiskowych i związków antybakteryjnych. 4. Możliwość zastosowania pigmentów bakteryjnych w medycynie i przemyśle. 5. Podsumowanie

#### Various functions of selected bacterial pigments

**Abstract:** Bacterial pigments are produced by numerous bacterial species. Their production gives the bacteria an advantage in their competition for environmental niches. Several pigments produced by pathogens, e.g. staphyloxanthin of *S. aureus* or pyocyanin of *P. aeruginosa* have been proved to be important factors of virulence and their modes of action are well established. In natural environment, such as soil or water, bacterial pigments are indispensable for photosynthesis. They are also able to protect bacteria against harmful effect of temperature, osmolarity, radiation and antibacterial compounds and also to help bacteria in iron acquisition via the pathways alternative to siderophores. Recently, studies have been conducted on antibacterial therapy based on pigment inhibition and the potential use of pigments in the industry and medicine, mainly as an anticancer agents.

**Introduction.** 2. Pigments as the virulence factors. 2.1. *Pseudomonas aeruginosa* and pyocyanin. 2.2. *Staphylococcus aureus* and staphyloxanthin. 2.3. Other pathogenic bacteria and their pigments. 3. Functions of pigments other than virulence determinants. 3.1. Photosynthesis. 3.2. Acquisition of iron. 3.3. Protection against harmful environmental factors and antibacterials. 4. Possibility of medical and commercial application of bacterial pigments. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** pigmenty bakteryjne, czynniki wirulencji, fotosynteza, pozyskiwanie żelaza, ochrona przed stresem

**Key words:** bacterial pigments, virulence factors, photosynthesis, iron acquisition, stress protection

## 1. Wstęp

Wiele gatunków bakterii należących do kilku typów taksonomicznych posiada zdolność do syntezy związków barwnych. Gatunki barwne, nie tylko bakteryjne, mają istotną przewagę w naturalnym środowisku bytowania, co jest szczególnie widoczne w przypadku zwierząt kręgowych, których jaskrawe ubarwienie zwiększa atrakcyjność osobników dla płci przeciwnej, ułatwia kamuflaż a także odstrasza potencjalnych wrogów. Wszystkie te korzyści związane są ze zdolnością zwierząt do percepcji różnych kolorów, co *a priori* jest niemożliwe u bakterii. Mimo tego, korzyści, które czerpią barwne bakterie są liczne i różnorodne, a ich przewaga selekcyjna nad gatunkami lub mutantami bezbarwnymi jest znaczna. Korzyści te polegają na: zdobywaniu pokarmu i energii (bakterie fotosyntetyzujące), pozyskiwaniu żelaza ze środowiska, ochronie przed szkodliwym działaniem światła widzialnego o dużym natężeniu, promieniowania ultrafioletowego, ekstremalnych temperatur, jak również związków o działaniu antybakteryjnym, produkowanych przez inne organizmy. Poza tym niektóre pig-

menty bakteryjne mają aktywność antybiotyczną oraz, co bardzo ważne, są czynnikami wirulencji chorobotwórczych bakterii. Te wszystkie naturalne funkcje bakteryjnych barwników będą omówione w następnych rozdziałach tego opracowania. Należy także zaznaczyć, że kolorystyka poszczególnych gatunków znajduje odbicie w ich nazwie, na przykład *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty) lub *Chromobacterium violaceum* (gatunek bakteryjny o zabarwieniu fioletowym). Pigmentacja jest także cechą ułatwiającą identyfikację danego gatunku, szczególnie istotną w diagnostyce klinicznej.

Badania funkcji barwników oraz szlaków ich biosyntezy w komórce bakteryjnej prowadzone są intensywnie od około 20 lat. Eksperymenty wykonuje się zarówno *in vivo*, głównie przez porównanie fenotypu bezbarwnego mutantu z barwnym szczepem wyjściowym, jak i *in vitro*, badając wpływ izolowanych pigmentów na środowisko (w wypadku bakterii chorobotwórczych na komórki zainfekowanego gospodarza). W ostatnich latach stało się możliwe wykorzystanie w tych badaniach technik stosowanych w biologii molekularnej i biotechnologii, co przybliży dogłębne

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel.: (22) 554 13 02, e-mail: izabelaw@biol.uw.edu.pl

poznanie zarówno regulacji syntezy pigmentów jak i mechanizmów różnorodnego (plejotropowego) ich działania na komórki organizmów wyższych oraz molekularnych podstaw udziału barwników w chorobotwórczości bakterii.

## 2. Pigmenty jako czynniki wirulencji

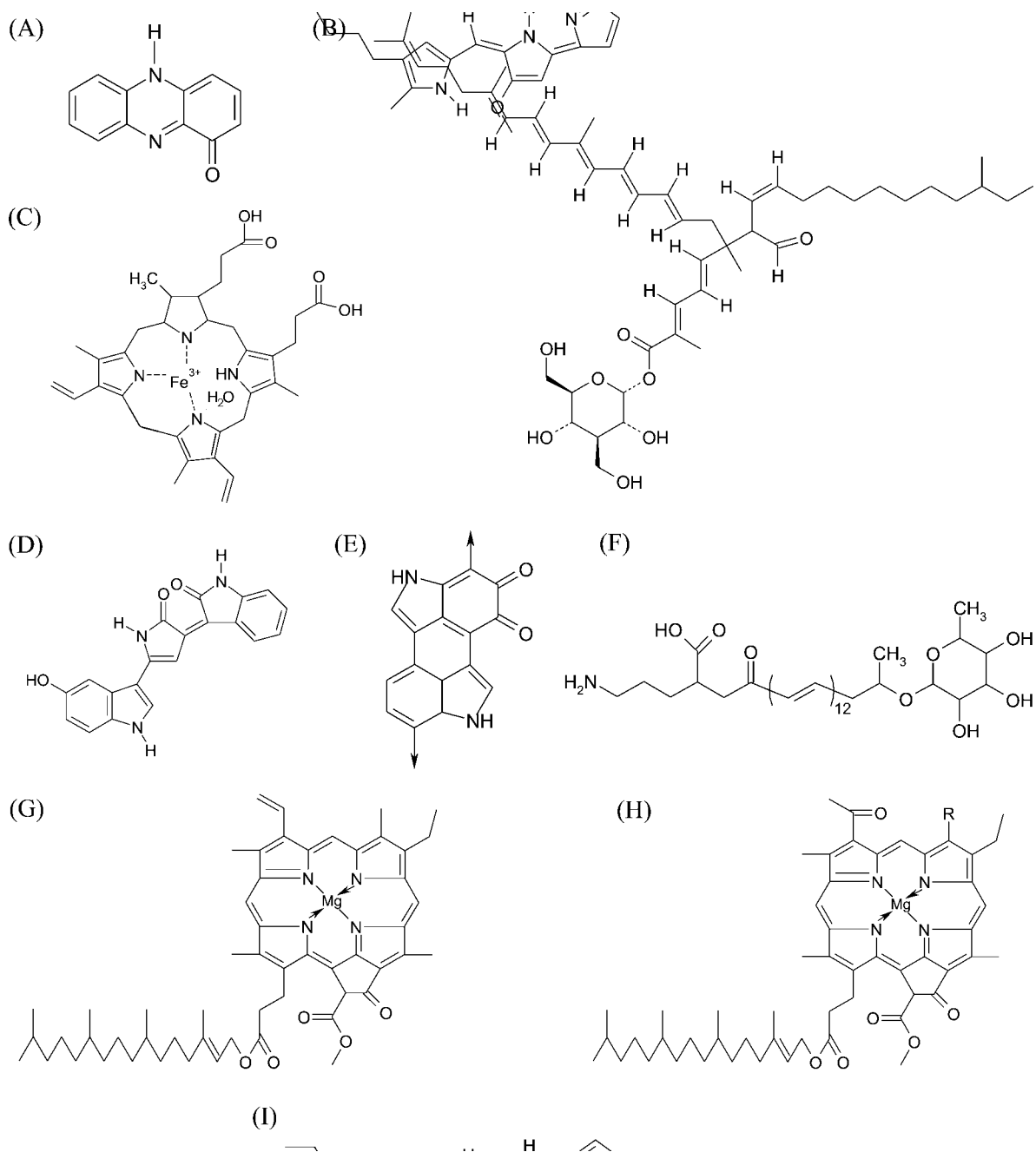
### 2.1. *Pseudomonas aeruginosa* i piocyjanina

Gramujemne pałeczki, *P. aeruginosa* (klasa *Gammaproteobacteria*, rodzina *Pseudomonadaceae*) charakteryzują się zdolnością do przeprowadzania bardzo licznych reakcji biochemicznych, które należą do różnorodnych szlaków metabolicznych. W związku z tym, bakterie te może rosnąć w różnych środowiskach i mają zdolność do infekcji wielu gatunków organizmów eukariotycznych, od ameby do człowieka. U ludzi wywołują liczne schorzenia, w tym: zapalenie ucha środkowego, zapalenie stawów, zapalenie wsierdzia, choroby układu moczowego, zakażenia ran, na przykład powstałych w wyniku poparzeń. Ogromny potencjał chorobotwórczy *P. aeruginosa* związany jest z syntezą przez tę bakterię kilku czynników wirulencji, z których najważniejszymi są proteazy, hemolizyny, adhezyny i egzotoksyny. Te ostatnie odpowiadają za martwicę tkanek i problemy z leczeniem zainfekowanych ran. Egzotoksyny są transportowane bezpośrednio do komórek eukariotycznych przez system sekrecji typu III, który, jako taki, może być także uważany za czynnik wirulencji tej bakterii [61]. Jednak, mimo obecności tak licznych czynników odpowiedzialnych za patogenność, gatunek ten rzadko infekuje osobniki zdrowe, a to ze względu na słabą zdolność do kolonizacji i niszczenia komórek nabłonka. Dlatego też *P. aeruginosa* jest klasycznym przykładem patogenu oportunistycznego, groźnego dla osób z obniżoną odpornością, z czym wiążą się różnorodne zakażenia szpitalne, których jest przyczyną. Do czynników ryzyka zakażeniem *P. aeruginosa* należą: AIDS, choroba nowotworowa, cukrzyca, a zwłaszcza mukowiscydoza.

Wolno żyjące komórki *P. aeruginosa* są niezwykle ruchliwe dzięki obecności długiej, pojedynczej rzęski umiejscowionej na biegunie bakterii. Gatunek ten ma także zdolność do wzrostu w postaci biofilmu. Pojedyncze komórki tworzące tę strukturę są zlepione, i przez to unieruchomione, przez wielocukier, alginian, tworzący tzw. macierz biofilmu [44]. Biofilmy tworzą się na granicy faz, a więc, między innymi, na powierzchniach urządzeń medycznych np. drenów, cewników, szkieł kontaktowych. Substancje antibakteryjne, w tym antybiotyki, słabo działają na bakterie znajdujące się w biofilmie; w związku z tym wszystkie patogeny zdolne do tworzenia biofilmów,

a szczególnie *P. aeruginosa*, stanowią duże zagrożenie zdrowotne.

*P. aeruginosa* wytwarza cztery pigmenty, z których najważniejszym jest piocyjanina, koloru niebiesko-zielonego. Barwnik ten jest wydzielany poza komórkę, nadając charakterystyczne szmaragdowe zabarwienie podłożu hodowlanemu lub wydzielinie płucnej osób zakażonych tym patogenem. Innymi barwnikami *P. aeruginosa* są: zielona, zdolna do fluorescencji fluoresceina (piowerdyna), czerwona piourubina oraz brązowa melanina. Barwa dwóch ostatnich bywa maskowana przez zielony kolor piocyjaniny. Piocyjanina (1-hydroksy-5-metylofenozyna) jest zwiterjonem (Rys. 1A). Tą nazwą określane są związki, w których w jednej cząsteczce i blisko siebie znajdują się grupy naładowane dodatnio i ujemnie. Taka struktura umożliwia swobodne przechodzenie cząstek przez błony biologiczne. Piocyjanina jest ważnym czynnikiem wirulencji *P. aeruginosa*. Powoduje znaczny wzrost stężenia reaktywnych form tlenu – RFT (ang. *reactive oxygen substances* – ROS) w komórkach eukariotycznych. Ma to związek ze zdolnością tego barwnika do przenoszenia elektronów ze związków zredukowanych, np. glutationu, na tlen, a to prowadzi do obniżenia w eukariotycznej komórce stężenia antyoksydantów z jednoczesnym zwiększeniem stężenia związków silnie utleniających, którymi są RFT [42]. Obserwowano również zahamowanie aktywności katalazy przez ten barwnik [41]. Wszystkie RFT zawierają w cząsteczkach reaktywne, niesparowane elektrony. Przykładami tych związków są wolne rodniki, nadtlenki oraz tlen singletowy ( $O = O$ ). Ograniczona ilość RFT powstaje w komórkach eukariotycznych jako naturalne produkty metabolizmu i pełni ważne funkcje w oksydatywnej, mitochondrialnej fosforylacji, apoptozie czy krzepnięciu krwi [35]. Zwiększenie stężenia RFT będące typowym skutkiem wielu infekcji bakteryjnych, nazywane stresem oksydacyjnym, jest ważnym czynnikiem obrony gospodarza przed infekującymi patogenami (patrz niżej). Jednak masywny, związany z aktywnością piocyjaniny stres oksydacyjny po infekcji *P. aeruginosa* ma wielorakie skutki destrukcyjne. Olbrzymie zwiększenie RFT w komórkach żernych – neutrofilach prowadzi do ich apoptozy, zanotowano również zmniejszenie wydzielania cytokin, co skutkuje supresją układu immunologicznego [2]. Oksydacyjny stres zaburza także homeostazę jonów wapnia, a co za tym idzie sekrecję śluzu, rytmiczny ruch rzęsek w górnych drogach oddechowych, a nawet prowadzi do uszkodzenia nabłonka [25]. Wyniki badań *in vivo* prowadzone na modelu mysim wykazały, że piocyjanina odpowiedzialna jest za nekrozę tkanki płucnej [29]. Barwnik ten ma także silne działanie antybiotyczne, co zostanie omówione w następnym rozdziale.



Rys. 1. Chemiczna struktura wybranych pigmentów bakteryjnych.

(A) piocyjanina *P. aeruginosa*, (B) stafyloksantyna *S. aureus*, (C) porfiryra *P. gingivalis*, (D) wiołaceina *C. violaceum*, (E) melanina *C. neoformans*, (F) granadyna streptokoków grupy B, (G) chlorofil a, (H) bakteriochlorofil a, (J) prodigiozyna *S. marcescens*

W tym miejscu należy wspomnieć, że niedawno ukazało się wyczerpujące opracowanie dotyczące innej klasy pigmentów – piowerdyn, fluoryzujących barwników) zaliczanych do sideroforów. W pracy można znaleźć informacje dotyczące, między innymi, roli piowerdyn w ochronie biologicznej roślin oraz o ich znaczeniu i zastosowaniu w medycynie [24].

## 2.2. *Staphylococcus aureus* i stafyloksantyna

*Staphylococcus aureus* (klasa *Bacilli*, rodzina *Staphylococcaceae*) jest Gram-dodatnim, koagulazododatnim ziarniakiem, którego komórki tworzą nieregularne skupienia przypominające grona. Bytuje głównie na skórze i błonach śluzowych naczelnych,

ale również innych ssaków i ptaków. Sporadycznie izolowany jest z gleby, wody słodkiej i morskiej, najprawdopodobniej z miejsc zanieczyszczonych produktami pochodzenia zwierzęcego. Szacuje się, że przynajmniej 10% populacji ludzkiej jest stale lub okresowo nosicielami *S. aureus*, najczęściej w jamie nosowej. W związku z powyższym gatunek ten może być określany mianem patogenu oportunistycznego. Mimo to schorzenia przez niego wywoływane są bardzo groźne i charakteryzują się dużą śmiertelnością. Z chorób o etiologii gronkowcowej należy wymienić: zakażenia skóry i tkanek miękkich (czyraki, jęczmień, ropnie – również ran pooperacyjnych, zapalenie sutka, zapalenie mieszków włosowych), infekcje układowe (zapalenie szpiku kostnego i kości, płuc, wsierdza, opon mózgowo-rdzeniowych, układu moczowego, posocznicy gronkowcowej), oraz choroby związane z działaniem swoistych toksyn (chorobę Rittera, zatrucia pokarmowe). *S. aureus* syntetyzuje wiele czynników wirulencji, z których szczególnie groźne są toksyny – enterotoksyny (odpowiedzialne za zatrucia pokarmowe), hemolizyny, koagulaza, egzofoliatyna, leukocydyna, czynnik CF, hialuronidaza, fibrylizyna. Należy jeszcze nadmienić, że gatunek ten ma dużą zdolność do wzrostu w postaci biofilmów, co podobnie jak w przypadku *P. aeruginosa*, potęguje jego chorobotwórczość. Ostatnio izoluje się coraz więcej szczepów opornych na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe powszechnie stosowane w leczeniu chorób wywoływanych przez gronkowce, czego przykładem są szczepy MRSA (methicilin resistant *S. aureus*) [16].

*S. aureus* wytwarza dwa pigmenty, złotą stafyloksantynę oraz, w mniejszej ilości, żółtą 4'4'-diaponeoporynę, które są odpowiedzialne za barwę komórek. Ta pierwsza jest ważnym czynnikiem wirulencji gronkowca [32]. Stafyloksantyna należy do karotenoidów. Związki te są powszechnie syntetyzowane przez rośliny ( $\beta$ -karoten), grzyby i glony. Wiele z nich znajduje zastosowanie w medycynie, kosmetologii i jako dodatek do pasz. Ostatnio wykazano, że dieta bogata w karotenoidy zmniejsza ryzyko zachorowania na raka [9]. Chemicznie, karotenoidy są mieszanymi cykliczno-liniowymi polienami; stafyloksantyna zawiera szkielet węglowy C30 z naprzemiennie ułożonymi pojedynczymi i podwójnymi wiązaniami (Rys. 1B) [46]. Taka budowa chemiczna sprawia, że stafyloksantyna, jak i inne karotenoidy, jest silnym antyoksydantem, łatwo ulega utlenieniu, absorbując energię z RFT [12]. Jak już wyżej wspomniano, po infekcji bakteryjnej ilość RFT w zaatakowanym organizmie wzrasta, zwłaszcza w komórkach żernych, między innymi neutrofilach, co ma zasadnicze znaczenie w procesie neutralizacji bakterii. Efektywność stafyloksantyny w usuwaniu RFT potęgowana jest jej komórkową lokalizacją – barwnik ten umiejscowiony jest w osłonach

komórkowych. Wykazano eksperymentalnie, że obecność stafyloksantyny czyni komórki bardziej opornymi na szkodliwe działanie wody utlenionej, podchlorynu i wolnych rodników oraz sprawia, że większa ilość bakterii przeżywa w neutrofilach [7]. Udowodniono również, że bezbarwny mutant *S. aureus* charakteryzuje się znacznie mniejszą patogennością dla myszy, po podskórnym wprowadzeniu zawiesiny bakterii [32].

### 2.3. Inne bakterie i ich pigmenty

*Porphyromonas gingivalis* (klasa *Bacteroidia*, rodzina *Porphyromonadaceae*) jest beztlenową bakterią wywołującą niektóre odmiany paradontozy. Oprócz tego może powodować schorzenia przewodu pokarmowego i układu oddechowego. Gatunek ten produkuje kolagenazę, i właśnie rozkład kolagenu przyczynia się do rozwoju paradontozy. Podczas wzrostu na agarze z krwią, bakteryjne kolonie mają czarne zabarwienie wskutek syntezy porfiryny. Porfiryny są związkami heterocyklicznymi, zawierającymi cztery pierścienie pirolowe (Rys. 1C) [5]. Pigment produkowany przez *P. gingivalis* powstaje w wyniku proteolitycznej degradacji hemoglobiny [51]. Porfiryna jest silnym przeciwutleniaczem i chroni komórki patogenu przed antybakteryjnym działaniem RFT [52].

Względnie beztlenowa, wytwarzająca antybiotyki bakteria, często izolowana z gleb i wód subtropikalnych i tropikalnych, *Chromobacterium violaceum* (klasa *Betaproteobacteria*, rodzina *Neisseriaceae*), może być sporadyczną przyczyną zakażeń skórnych i sepsy [11]. Gatunek ten zdolny jest do produkcji kilku antybiotyków, a w obecności tlenu wytwarza fioletowy barwnik, wiołaceinę, która ma również właściwości antybiotyczne, o czym będzie wzmianka w następnym rozdziale. Wiołaceina, właściwie wiołaceina 5 (Ryc. 1D), jest pochodną pirolidyny i wytwarzana jest z L-tryptofanu i cząsteczkowego tlenu przy udziale pięciu enzymów, VioA – E [3]. Podobnie do uprzednio omówionych pigmentów, barwnik ten jest silnym przeciwutleniaczem, wydajnie usuwającym RFT z komórek eukariotycznych. Wydaje się, że wiołaceina ma szczególne znaczenie w ochronie przed utlenianiem lipidów znajdujących się w osłonach bakteryjnych [28].

Stosunkowo nieliczne bakterie chorobotwórcze, w tym *Proteus mirabilis* (klasa *Gammaproteobacteria*, rodzina *Enterobacteriaceae*) wywołujący zakażenia układu moczowego i ran, *Vibrio cholerae* (klasa *Gammaproteobacteria*, rodzina *Vibrionaceae*), czynnik etiologiczny cholery oraz *Burkholderia cenocepacia* (klasa *Betaproteobacteria*, rodzina *Burkholderiaceae*), która jest oportunistycznym patogenem i powoduje infekcje osób chorych na mukowiscydozę i chroniczną granulocytozę, mają zdolność do syntezy ciemnobrązowych lub czarnych barwników z grupy melanin

[39]. W tym miejscu należy nadmienić, że barwniki te są bardzo rozpowszechnione u *Eukaryota*, występują u zwierząt i patogennych grzybów takich jak *Cryptococcus neoformans* i *Aspergillus fumigatus* [34]. Liczne pozycje literaturowe dotyczą funkcji melanin właśnie u tych organizmów. Wszystkie pigmenty należące do tej grupy są związkami charakteryzującymi się dużą masą cząsteczkową i ujemnym ładunkiem, składają się z reszt fenolowych i indolowych (Rys. 1E) [59]. Melaniny stanowią przykład silnych przeciwutleniaczy, stabilizują wolne rodniki, mają zdolność do wiązania niesparowanych elektronów w RFT, z czym wiąże się ich działanie ochronne dla komórek bakteryjnych, a to pociąga za sobą zwiększoną wirulencję szczepów produkujących te pigmenty [38].

Paciorkowce należące do grupy B (klasa *Bacilli*, rodzina *Streptococcaceae*) syntetyzują czerwono-pomarańczowy pigment, granadyne, pochodną ornityny (Rys. 1F) [49]. Ta grupa bakterii wywołuje groźne infekcje u noworodków, a wirulencja szczepów związana jest między innymi z produkcją barwnika, czemu towarzyszy synteza innego czynnika wirulencji, beta hemolizyny/cytolizyny [53]. Eksperymentalnie udowodniono zwiększone przeżycie barwnych paciorkowców w makrofach wskutek ich zdolności do usuwania RFT [31].

Przedstawione przykłady przekonują, że wirulencja bakterii związana jest w znacznym stopniu z ich zdolnością do syntezy barwników, które zazwyczaj pełnią funkcję polegającą na ochronie patogenów przed destrukcyjnym działaniem RFT, a u *P. aeruginosa* indukują wzmożoną produkcję RFT, co z kolei działa szkodliwie na komórki żerne makroorganizmu. W związku z powyższym, podjęcie prób zbadania zastosowania związków hamujących szlaki syntezy barwników w terapii chorób wywoływanych przez barwne patogeny wydaje się działaniem celowym. Jak dotąd sukcesy na tym polu nie są liczne, choć takie podejście *a priori* ma przewagę nad innymi rodzajami terapii np. stosowaniem antybiotyków, ponieważ pozwala na eliminację specyficznego gatunku. Najwięcej publikacji dotyczy potencjalnych możliwości leczenia chorób wywoływanych przez *Cryptococcus neoformans* przez zahamowanie produkcji melaniny przez ten grzyb [40], a więc opis uzyskanych wyników przekracza ramy tego opracowania. Wydaje się, że podobny rodzaj terapii może niedługo znaleźć zastosowanie w leczeniu paradontozy wywołanej przez *P. gingivalis* po zastosowaniu silnego, monochromatycznego światła, które jest pochłaniane przez czarny pigment, porfiryne [1]. Duże nadzieje wiąże się również z leczeniem chorób powodowanych przez *S. aureus*. Jak wspomniano, złocisty barwnik produkowany przez tę bakterię jest karotenoidem. Szlak jego syntezy ma początkowe etapy, katalizowane przez białko CrtA,

wspólne z etapami biosyntezy cholesterolu u ludzi katalizowanymi przez syntetazę skwalenową [7]. W związku z tym, inhibitory syntetazy skwalenowej np. fosfonosulfonian, hamują również wytwarzanie barwnika przez *S. aureus*, czyniąc komórki bakteryjne bardziej podatnymi na usuwanie przez RFT. Udowodniono eksperymentalnie 98% skuteczność tego związku w eliminacji patogenu eksperymentalnie wprowadzonego do myszy [33].

### 3. Funkcje pigmentów nie związane z chorobotwórczością

#### 3.1. Fotosynteza

Niewątpliwie najważniejszą funkcją barwników jest ich kluczowa rola jaką pełnią w procesie fotosyntezy. Organizmy prokariotyczne, podobnie jak rośliny wyższe, mają zdolność do przeprowadzania fotosyntezy, która jest procesem dostarczającym organizmowi energii chemicznej powstałej w wyniku przetworzenia energii świetlnej oraz budulca w postaci produktów asymilacji dwutlenku węgla. Warunkiem zajścia tego procesu jest obecność w ich komórkach specyficznych barwników lub ich kompleksów odnajdywanych w różnych strukturach, które dzielą się na: chromatofory (u bakterii purpurowych i siarkowych), tylakoidy (u sinic) oraz chlorosomy – błoniaste struktury uformowane w rurki (u bakterii zielonych). We wszystkich układach fotosyntetycznych zawarte są substancje fotochemicznie czynne, można tu wyróżnić: chlorofile *a*, *b*, *d*, karotenoidy, fikobiliny oraz bakteriochlorofile *a*, *b*, *c*, *d*, *e* i *g*. W skład cząsteczki chlorofilu wchodzi cztery pierścienie pirolowe połączone mostkami (=CH-) tworzące porfiryne, z której po dołączeniu łańcuchów bocznych, powstaje porfiryne [14]. Chlorofile zawierają 2 grupy karboksylowe, z których jedna jest zawsze zestyfikowana długołańcuchowym niepolarnym alkoholem (najczęściej fitolem). Chlorofil *a* przy drugim pierścieniu pirolowym posiada grupę -CH<sub>3</sub>, a chlorofil *b* -CHO. Centralną pozycję w układzie porfirynowym, zajmuje atom Mg związany z atomami azotu. Absorbencja energii świetlnej prowadzi do wyrzucenia z cząsteczki chlorofilu elektronów o dużej energii, które przechodząc przez łańcuch transportu elektronów dostarczają energii do wytworzenia siły protonomotorycznej i/lub bezpośredniej redukcji NADP. U cyanobakterii (sinic) fotosynteza przebiega inaczej niż u bakterii anoksygenowych (tj. nie wytwarzających tlenu), takich jak bakterie purpurowe i zielone i jest przykładem oksygenicznego typu fotosyntezy bardzo zbliżonego do fotosyntezy roślin [14, 17]. W bakteriochlorofilach zamiast alkoholu – fitolu może występować farnesol lub geranylogeraniol. Wzory strukturalne

chlorofilu *a* oraz bakteriochlorofilu *a* zostały przedstawione na rys. 1G i H. Barwnikami pełniącymi rolę pomocniczą w procesie fotosyntezy są karoteny i ksantofile [56]. Pochłaniają one promieniowanie niebiesko-fioletowe i przekazują energię chlorofilowi *a*, ponadto chronią chlorofil przed fotooksydacją możliwą w warunkach nadmiernego oświetlenia. Podstawową jednostką strukturalną karotenów jest izopren [56, 19]. Wzór przykładowego karotenoidu został uprzednio omówiony na przykładzie stafyloksantyny *S. aureus*.

Bakterie fotosyntezujące można podzielić na cztery grupy: (1) *Cyanobacteria* (sinice), (2) bakterie zielone (*Chlorobiaceae*, *Chloroflexaceae*), (3) bakterie purpurowe siarkowe (*Chromatiaceae*) oraz (4) purpurowe bakterie bezsiarkowe (*Rhodospirillaceae*). Cyanobakterie to grupa bakterii silnie zróżnicowana morfologicznie, większość z nich zawiera chlorofil *a* z maksimum absorpcji P700 i P680, natomiast zamiast chlorofilu *b* występują u nich fikobiliny, do których zalicza się fikocjaninę (PC), oraz rzadziej spotykaną fikoerytrynę (PE). Te barwniki odnajdywane są w strukturach fikobilisomów, absorbują światło barwy żółtej oraz zielono-żółtej [17, 48]. Wszystkie cyjanobakterie wiążą CO<sub>2</sub> w cyklu Calvina, nie mają pełnego cyklu Krebsa, część z nich wiąże N<sub>2</sub>. Natomiast sinice zaliczane do rzędu *Prochlorales*, (np.: *Prochlorothrix*, *Prochloroflexus*, *Prochlorococcus* i *Prochloron*, który jest bezwzględnym symbiontem żachw) zawierają chlorofil *a* i *b*. Fotosyntezujące bakterie zielone (*Chlorobiaceae* i *Chloroflexaceae*), przeprowadzają ten proces przy udziale bakteriochlorofilu, zachodzi u nich fosforylacja cykliczna [17]. Źródłem elektronów dla bakteriochlorofilu jest wodór lub związki siarki. *Chlorobiaceae* posiadają niewielkie ilości bakteriochlorofilu *a* z maksimum absorpcji P840, natomiast nitkowate *Chloroflexaceae* bakteriochlorofilu *a* z maksimum absorpcji P865. Poza tym występują u nich bakteriochlorofile *c*, *d* oraz *e*, które pochłaniają światło 800, 850 i 870 nm [17, 19, 23, 48]. Z kolei *Heliobacteriaceae*, brązowo-zielone anoksygenowe fototrofy, (dotychczas opisano czterech przedstawicieli tej grupy bakterii: *Heliobacterium*, *Heliophilum*, *Heliorestis* i *Heliobacillus*), nie posiadają typowych barwników asymilacyjnych, mają natomiast zlokalizowany w błonie komórkowej bakteriochlorofil *g* o maksimum absorpcji P798, którego budowa jest bardzo zbliżona do chlorofilu *a*. Większość tych bakterii korzysta z nietypowych dawców elektronów, którymi są związki organiczne (alkohole, octan, pirogronian) [17, 20, 48].

Bakterie purpurowe zawierają bakteriochlorofile *a* i *b*, jednak ich barwa jest przesłonięta przez czerwone i brązowe karotenoidy. Wyróżnia się tu dwie rodziny: bakterie purpurowe siarkowe – *Chromatiaceae*, które są wyłącznie beztlenowe, zawierają globule siarki silnie załamujące światło i bakteriochlorofile *a* i *b* z ma-

ksimami absorpcji P870 i P890, odpowiednio, oraz bakterie purpurowe bezsiarkowe – *Rhodospirillaceae*, które w warunkach tlenowych przechodzą na heterotrofizm. Maksimum absorpcji ich bakteriochlorofilu *a* wynosi P870 a bakteriochlorofilu *b* – P960. U bakterii należących do *Chromatiaceae* (np. *Chromatium*, *Thiospirillum*, *Thiophlycoccus*) donorami elektronów są: siarkowodór, siarka i wodór oraz czasami związki organiczne (kwasy), natomiast *Rhodospirillaceae* (*Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodocycilus* i *Rhodopila*) jako donory elektronów do procesu fotosyntezy wykorzystują różne związki organiczne, a niektóre mogą też wykorzystywać siarkowodór, siarkę i wodór [19, 23, 57].

Barwniki pełnią szczególną rolę u pewnych przedstawicieli *Archea*, które są zdolne do wykorzystywania energii słonecznej, chociaż nie potrafią przeprowadzać fotosyntezy. Na przykład tlenowy *Halobacterium salinarum* na świetle, w warunkach beztlenowych lub przy małej zawartości tlenu, wytwarza błonę purpurową, która jest częścią błony cytoplazmatycznej. Głównym barwnikiem purpurowym jest tu bakteriorodopsyna, zawierająca światłoczuły związek karotenowy, retinal. Po absorpcji energii świetlnej cząsteczka bakteriorodopsyny przechodzi bardzo szybko w stan wzbudzenia i po pochłonięciu fotonu przenosi przez błonę jony wodorowe. W rezultacie tworzony jest w błonie silny gradient elektrochemiczny, który bakterie wykorzystują do syntezy ATP. Błona ulega ponownej regeneracji przy udziale protonów znajdujących się w cytoplazmie, opisany proces jest więc pewną formą fosforylacji. *Halobacterium* jest zatem zdolny do korzystania z energii świetlnej w celu uzyskania energii w postaci ATP, nie jest jednak autotrofem. Halobakterie, żyjąc w środowisku silnie naświetlonym, zawierają duże ilości karotenoidów nadających im barwę różową i chroniących wewnątrz komórki przed uszkodzeniem fotochemicznym [15, 20, 54].

### 3.2. Pozyskiwanie żelaza

*Legionella pneumophila* (klasa *Gammaproteobacteria*, rodzina *Legionellaceae*) jest Gram-ujemną bakterią zasiedlającą środowiska wodne i zdolną do wywoływania ostrej formy zapalenia płuc u człowieka. *L. pneumophila* pozyskuje żelazo, głównie dzięki wytwarzaniu syderoforów (legiobaktyn). Niedawno opisano komplementarny system pozyskiwania tego pierwiastka przy udziale pigmentu – piomelaniny związanej z aktywnością reduktazy żelazowej [6]. Można przypuszczać, że melaniny produkowane przez inne bakterie należące do rodzajów: *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* i *Vibrio* również uczestniczą w pozyskiwaniu żelaza. U Gram-ujemnej bakterii *Shewanella algae* (także

u grzyba *C. neoformans*) opisano mechanizm redukcji tlenku żelaza przy udziale melaniny jako przekaźnika elektronów. Również *P. aeruginosa* jest zdolny do pozakomórkowej redukcji żelaza przy udziale piocyjaniny [6].

### 3.3. Ochrona przed szkodliwym działaniem czynników środowiskowych i związków antybakteryjnych

Postuluje się, że zdolność mikroorganizmów do wytwarzania pigmentów pierwotnie wyewoluowała jako mechanizm nadający komórkom oporność na działanie reaktywnych form tlenu, co prowadzi nie tylko do zwiększenia przeżywalności bakterii w zainfekowanym gospodarzu, lecz również w środowisku zewnętrznym. Z biegiem czasu pigmenty zostały zaadaptowane do pełnienia funkcji chroniących mikroorganizmy przed uszkodzeniami wywołanymi przez inne czynniki fizykochemiczne [34]. Istnieją liczne doniesienia wykazujące, że melaniny są odpowiedzialne za ochronę komórek mikroorganizmów przed uszkodzeniami wywołanymi takimi czynnikami środowiska jak promieniowanie UV i jonizujące, ekstremalne temperatury, czynniki utleniające, metale ciężkie, związki antybiotyczne [8, 26, 39, 43]. Melaniny nie tylko mogą chronić DNA i inne związki przed uszkodzeniami po działaniu promieniowania UV, ale również ochraniają enzymy przed proteazami, a komórki przed enzymami hydrolitycznymi. Zapobiegają także degradacji biofilmu i mogą pełnić rolę w przepływie protonów i substancji odżywczych w biofilmie [58, 60].

Literatura opisująca ochronną rolę melaniny u mikroorganizmów żyjących w takich środowiskach jak gleba i woda w większości dotyczy grzybów, nieliczne prace odnoszą się do bakterii. Barwnik ten syntetyzowany przez *Vibrio cholerae* chroni bytujące w wodzie komórki przed stresem osmotycznym i podwyższoną temperaturą. Warunki te spotykane są w miesiącach letnich, gdy wraz ze wzrostem temperatury wzrasta zasolenie wody. Zdolność melaniny do ochrony bakterii przed stresem osmotycznym opiera się na jej zdolności do absorpcji kationów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , zapobiegając odwodnieniu komórki [8]. Melanina niweluje również skutki stresu oksydacyjnego, co jest szczególnie istotne w porze letniej, kiedy w wyniku wzrostu intensywności promieniowania UV wzrasta stężenie wolnych rodników w wodach powierzchniowych, osiągając poziom  $1\text{--}12 \times 10^{-18}$  M. Barwny mutant *V. cholerae*, oprócz zwiększonej infekcyjności, charakteryzuje się podwyższoną odpornością na promieniowanie UV ( $100, 200, 300 \mu\text{J}/\text{m}^2$ ), czego przyczyną jest preferencyjne absorbowanie energii tego promieniowania przez melaninę [58]. Wykazano również, że melanina *Bacillus thuringiensis* chroni tę bakterię przed szkodliwym działaniem promieni UV z jednoczesnym

zwiększeniem jego toksyczności wobec owadów [45]. W tym przypadku zwiększoną odporność na UV należy wiązać z obecnością melaniny w osłonach endospor, a zwiększoną toksyczność ze zwiększoną stabilnością insektycydu wynikającą z adsorpcji lub wbudowania melaniny do kryształów toksycznego białka powstającego podczas sporulacji. Te dane mają duże znaczenie aplikacyjne ze względu na to, że skuteczność *B. thuringiensis* jako bio-insektycydu zależy głównie od przeżycia bakterii i stabilności jej toksyny w warunkach polowych, gdzie głównym czynnikiem destabilizującym jest nasłonecznienie [45].

Melaniny są także zdolne do wiązania metali ciężkich. Grupy karboksylowe, fenolowe, hydroksylowe i aminowe występujące licznie w melaninach stanowią potencjalne miejsca wiązania lub adsorpcji dla jonów metali. Te właściwości melaniny sugerują mniejszą skuteczność zawierających metale środków przeciwgrzybiczych i antybakteryjnych w eliminacji mikroorganizmów wytwarzających ten pigment [39]. W badaniach *in vitro* wykazano: wiązanie się melaniny do różnych pod względem budowy chemicznej związków, jej interakcje z wieloma lekami, zdolność do adsorpcji porównywalną do węgla aktywowanego. Mechanizm nabywania oporności na leki przez grzyby produkujące melaninę polega na wydajnym wiązaniu ich przez warstwę pigmentu w ścianie i zapobieganiu w osiągnięciu celu wewnątrz komórki. Natomiast ochronny wpływ melaniny bakteryjnej może być ograniczony jej nieznaną lokalizacją w komórce [39].

U bakterii izolowanych z powietrza i u niektórych wolno żyjących, oportunistycznych mykobakterii, w tym *Mycobacterium kansasii* i *M. marinum* [50] oraz u *Deinococcus radiodurans* (klasa *Deinococci*, rodzina *Deinococcaceae*) rolę ochronną przed stresem oksydacyjnym pełnią karotenoidy. Tu należy wspomnieć, że duża oporność *D. radiodurans* na stres oksydacyjny jest jedną z licznych oporności tej bakterii na szkodliwe warunki środowiska w tym: promieniowanie jonizujące, podwyższoną temperaturę, zakwaszenie, obecność trucizn i brak związków odżywczych [55].

### 4. Możliwość zastosowania bakteryjnych pigmentów w medycynie i przemyśle

Największe nadzieje na zastosowanie bakteryjnych pigmentów w medycynie wiąże się z prodigiozyną, czerwonym barwnikiem syntetyzowanym przez *S. marcescens* (grupa *Gammaproteobacteria*, rodzina *Enterobacteriaceae*). Pigment ten należy do grupy amin i składa się z pierścieni pirolowych (Rys. 1J). Liczne badania prowadzone w wielu laboratoriach wykazały, że barwnik ten ma bardzo silne działanie cytotoksyczne na komórki kilku linii tkankowych. Wykazano również,

że pigment ten należy do inhibitorów cyklu komórkowego, degraduje DNA, zmienia wewnątrzkomórkowe pH, jak również indukuje apoptozę [47]. Stwierdzono również jego aktywności immunosupresyjną wobec limfocytów T, co ma związek z blokowaniem proliferacji limfocytów zależnej od interleukiny 2 [18]. Z kolei eksperymenty prowadzone na zwierzętach udowodniły, że prodigiozyna blokuje rozwój nowotworów, odrzut przeszczepów, np. serca i skóry, oraz hamuje początkowe etapy cukrzycy i artretyzmu [18]. Drugim pigmentem działającym anty-nowotworowo jest wiołaceina, która niszczy komórki nowotworowe jelita grubego i tęczówki oraz hamuje proliferację limfocytów i działanie cytokin, powoduje apoptozę komórek linii HL60, za co odpowiedzialna jest aktywacja receptora 1 dla czynnika martwicy nowotworów, TNF (tumor necrosis factor) odpowiedzialnego za transdukcję sygnału. [13, 27]. Barwnik ten ma także działanie antybiotyczne i jest szczególnie efektywny w eliminacji pierwotniaka *Leishmania amazoniensis*, czynnika etiologicznego różnego rodzaju leiszmanioz: trzewnych, skórnych i skórno-słuzówkowych [30]. Istnieją również doniesienia o antybiotycznym działaniu piocyjaniny. Barwnik ten wykazuje działanie bakteriobójcze, szczególnie silnie eliminuje tlenowe bakterie Gram-dodatnie. Bakterie Gram-ujemne, a zwłaszcza beztlenowce są eliminowane znacznie słabiej [4]. Z kolei dość wiele pozycji literaturowych dotyczy możliwości zastosowania melaniny w kosmetologii, a zwłaszcza w medycynie. Syntetyczna melanina hamuje działanie prozapalnych cytokin, TNF, interleukiny (IL)-1 $\beta$ , IL-6 i IL-10 [38]. Żadna z tych prac nie opisuje jednak działania barwników syntetyzowanych przez bakterie.

Na zakończenie wykazu zastosowań pigmentów w medycynie i przemyśle należy wspomnieć o rosnącym zainteresowaniu astaksantyną, pomarańczowym barwnikiem syntetyzowanym przez rośliny i mikroorganizmy, w tym przez gatunki z rodzaju *Paracoccus*, włączając szczep *P. marcusii* OS22 (klasa *Alphaproteobacteria*, rodzina *Rhodobacteriaceae*), który został wyizolowany z nieczynnej kopalni złota w Złotym Stoku [10]. Za syntezę astaksantyny odpowiedzialne są geny *crt* odnajdywane w wielu gatunkach *Paracoccus*, choć sugerowana jest możliwość zaangażowania również innych genów w produkcję tego barwnika [36]. Astaksantyna jest stosowana jako składnik leków i preparatów wzmacniających. Dzięki zdolności do nadawania intensywnego, pomarańczowego zabarwienia produktom pochodzenia zwierzęcego wykorzystywana jest w przemyśle spożywczym jako barwnik żywności, z kolei dzięki aktywności przeciw utleniającej – jako jej konserwant [21, 22]. Obecnie prowadzone są intensywne badania mające na celu skonstruowanie genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów zdolnych do wydajnej i kontrolowanej produkcji tego pigmentu.

## 5. Podsumowanie

Liczne gatunki bakterii, w tym patogeny, zdolne są do produkcji barwników. Pigmenty bakteryjne pełnią różnorodną funkcję, zawsze korzystną dla ich producentów. Znana jest rola barwników jako czynników wirulencji patogennych bakterii. W przypadku piocyjaniny *P. aeruginosa* i stafyloksantyny *S. aureus*, mechanizm wirulencji związanej z produkcją barwników jest dobrze poznany na poziomie molekularnym. Badania innych pigmentów nie są tak zaawansowane. Podstawową rolę barwników w zwiększeniu patogenności ich producentów pełni zdolność pigmentów do ochrony komórek przed działaniem układu odpornościowego gospodarza, co jest związane ze zmniejszeniem stężenia reaktywnych form tlenu w komórkach żernych. Z kolei bakteryjne chlorofile i bakteriochlorofile pełnią kluczową rolę w procesie fotosyntezy. Barwniki mają także znaczenie w pozyskiwaniu żelaza, np. piomelanina u *L. monocytogenes* lub w ochronie przed szkodliwym działaniem promieniowania, np. melanina u *V. cholerae*. Ostatnio prowadzone są intensywne badania mające na celu opracowanie terapii antybakteryjnych opartych na zahamowaniu produkcji i/lub aktywności pigmentów. Z drugiej strony bada się możliwość wykorzystania pigmentów w przemyśle, głównie spożywczym i kosmetycznym, oraz w medycynie, np. w terapiach antynowotworowych, co dotyczy wiołaceiny *C. violaceum* i prodigiozyny *S. marcescens*.

## Piśmiennictwo

- Allaker R.P., Douglas C.W.: Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **33**, 8–13 (2009)
- Allen L.: Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses *in vivo*. *J. Immunol.* **174**, 3643–3649 (2005)
- Balibar C.J., Walsh C.T.: *In vitro* biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry*, **45**, 15444–15457 (2006)
- Baron S., Rowe J.J.: Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial Agents Chemother.* **20**, 814–830 (1981)
- Bojarski J.: Chemia organiczna. 4 wydanie, Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 1999
- Chatfield C.H., Cianciotto N.P.: The secreted pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity. *Infect Immun.* **75**, 4062–4070 (2007)
- Clauditz A., Resh A., Wieland K.-P., Peschel A., Götz F.: Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect. Immun.* **74**, 4950–4953 (2006)
- Coyne V.E., Al-Harhi L.: Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2861–2865 (1992)
- Das A., Yoon S.H., Lee S.H., Kim J.Y., Oh D.K., Kim S.W.: An update on microbial carotenoid production: application



- of recent metabolic engineering tools. *Appl. Microbiol. Biotech.* **77**, 505–512 (2007)
10. Drewniak L., Styczek A., Majder-Lopatka M., Skłodowska A.: Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution. *Environ. Pollut.* **156**, 1069–1074 (2008)
  11. Duran N., Menck C.F.: *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial properties. *Crit. Rev. Microbiol.* **27**, 201–222 (2001)
  12. El-Agamey A., Lowe G.M., McGarvey D.J., Mortensen A., Phillip P.M., Triscott T.G., Young A.J.: Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **430**, 37–48 (2004)
  13. Ferreira C.V., Bos C.L., Versteeg H.H., Justo G.Z., Durán N., Peppelenbosch M.P.: Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood*, **104**, 1459–1464 (2004)
  14. Gomez Maqueo Ch.A., Bryant D.A.: Chlorophyll biosynthesis in bacteria: The origins of structural and functional diversity. *Annual Rev. Microbiol.* **61**, 113–129 (2007)
  15. Gonzalez O., Gronan S., Pfeiffer F., Mendoza E., Zimmer R., Oesterhett D.: Systems analysis of bioenergetics and growth of the extreme halophile *Halobacterium salinarum*. *PLoS Comput. Biol.* **5**(4): e1000332 (2009)
  16. Götz F., Bannerman T., Schleifer K.-H.: The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus* (w) The Prokaryotes, tom 4, 3. wydanie., red. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt, Springer Science + Media LLC, New York, NY, USA, 2006, s. 704
  17. Greenblatt C.L., Davis A., Clement B.G., Kitts C.L., Cox T., Cano R.J.: Diversity of microorganisms isolated from amber. *Microbiol. Ecol.* **38**, 58–68 (1999)
  18. Han S.B., Park S.H., Jeon Y.K., Kim Y.K., Kim H.M., Yang K.H.: Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin-2/Ralpha expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen-induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 415–425 (2001)
  19. Hauska G., Schoedl T., Remigy H., Tsiotis G.: 2001 The reaction center of green sulfur bacteria. *Bioch. Biophys. Acta*, **1–3**, 260–77 (2001)
  20. Heinrickel M., Golbeck J.H.: Heliobacterial photosynthesis. *Photosynthesis Res.* **1**, 35–53 (2007)
  21. Higuera-Ciajara I., Félix-Valenzuela L., Goyoodea F.M., 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 185–196 (2007)
  22. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H.: Astaxanthin, a carotenoid with potential human health and nutrition. *J. Nat. Prod.* **69**, 443–449 (2006)
  23. Ishikita H., Saenger W., Biesiadka J., Loll B., Knapp E.W.: How photosynthetic reaction centers control oxidation power in chlorophyll pairs P680, P700, and P870. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **26**, 9855–60 (2006)
  24. Jankiewicz U.: Charakterystyka i znaczenie piowerdyn bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. *Post. Mikrobiol.* **48**, 243–254 (2009)
  25. Kanthakumar K., Taylor G., Tsang K.W., Cudell D.R., Rutman A., Smith S., Jeffery P.K., Cole P.J., Wilson R.: Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat *in vitro*. *Infect. Immun.* **61**, 2848–2853 (1993)
  26. Keith K.E., Killip L., He P., Moran G.R., Valvano M.A.: *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. *J. Bacteriol.* **189**, 9057–9065 (2007)
  27. Kodach L.L., Bos C.L., Durán N., Peppelenbosch M.P., Ferreira C.V., Hardwick J.C.: Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, **27**, 508–516 (2006)
  28. Konzen M., De Marco D., Cordova C.A., Vieira T.O., Antônio R.V., Creczynski-Pasa T.B.: Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 8307–8313 (2006)
  29. Lau G.W., Ran H., Kong F., Hassel D.J., Mavrodi D.: *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect. Immun.* **72**, 4275–4278 (2004)
  30. Leon L.L., Miranda C.C., De Souza A.O., Durán N.: Anti-leishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 449–450 (2001)
  31. Liu G.Y., Doran K.S., Lawrence T., Turkson N., Pulti M., Tissi L., Nizet V.: Sword and shield: linked group B streptococcal beta hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14491–14496 (2004)
  32. Liu G.Y., Essex A., Buchanan J.T., Datta V., Hoffman H.M., Bastian J.F., Fierer J., Nizet V.: *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J. Exp. Med.* **202**, 209–215 (2005)
  33. Liu C.-I., Liu G.Y., Song Y., Yin F., Hensler M.E., Jeng W.-Y., Nizet W., Wang A. H., Oldfield E.: A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science*, **319**, 1391–1394 (2008)
  34. Liu G. Y., Nizet V.: Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol.* **17**, 406–413 (2009)
  35. Łuszczewski A., Matyska-Piekarska E., Trefler J., Wawer I., Łącki J., Śliwińska-Stańczyk P.: Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia*, **45**, 284–289 (2007)
  36. Mizawa N., Satomi Y., Kondo K., Yokoyama A., Kaijwara S., Saito T., Ohtani T., Miki W.: Structure and functional analysis of marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthesis pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* **177**, 6575–6584 (1995)
  37. Mohagheghpour N., Waleh N., Garner S.J., Dousman L., Grill L.K., Tusé D.: Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. *Cell Immunol.* **199**, 25–36 (2000)
  38. Nosanchuk J.D., Casadevall A.: The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* **5**, 203–223 (2003)
  39. Nosanchuk J.D., Casadevall A.: Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3519–3528 (2006)
  40. Nosanchuk J.D., Ovalle R., Casadevall A.: Glyphosate inhibits melatonin of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. *J. Infect. Dis.* **183**, 1093–1099 (2001)
  41. O'Malley Y.Q., Reszka K.J., Rasmussen G.T., Abdalla M.Y., Denning G.M., Britgan B.E.: The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **285**, L1077–1086 (2003)
  42. O'Malley Y.Q., Reszka K.J., Spitz D.R., Denning G.M., Britgan B.E.: *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its level in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **287**, L94–103 (2004)

43. Paolo Jr.W.F., Dadachova E., Mandal P., Casadevall A., Szaniszlo P.J., Nosanchuk J.D.: Effect of disrupting the polyketide gene WdPKSI in *Wangiella [Exophiala] dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes temperature. *BMC Microbiology*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180-6-55> (2006)
44. Parsek M.R., Singh P.K.: Bacterial biofilms. An emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 677–701 (2003)
45. Patel K., Wyman J., Patel K., Burden B.: A mutant of *Bacillus thuringiensis* producing a dark-brown pigment with increased UV resistance and insecticidal activity. *J. Invertebr. Pathol.* **67**, 120–124 (1996)
46. Pelz A., Wieland K.P., Putzbach K., Hentschel P., Albert K., Götz F.: Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **280**, 32493–32498 (2005)
47. Perez-Tomas R., Montaner B., Llagostera E., Soto-Cerrato V.: The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1447–1452 (2003)
48. Pierson B.K., Thornber J.P.: Isolation and spectral characterization of photochemical reaction centers from the thermo-philic green bacterium *Chloroflexus aurantiacus* strain J-10-f1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 80–84 (1983)
49. Rosa-Fraile M., Rodrigez-Granger J., Haidour-Benamin A., Cueva J.M., Sampedro A.: Granadaene: proposed structure of the group B *Streptococcus* polyenic pigment. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6367–6370 (2006)
50. Silcox V.A., David H.L.: Differential identification of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium marinum*. *Appl. Microbiol.* **21**, 327–334 (1971)
51. Smalley J.W., Silver J., Briss A.J., Withnall R.: The haem pigment of the oral anaerobes *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* is composed of iron(III) protoporphyrin IX in the monomeric form. *Microbiology*, **149**, 1711–1718 (2003)
52. Smalley J.W., Silver J., Marsh P.J., Briss A.J.: The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the mu-oxo dimeric form: an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. *Biochem. J.* **331** (Pt 3), 681–685 (1998)
53. Spellerberg B., Martini B., Brand C., Lütticken R.: The *cyl* genes of *Streptococcus agalactiae* are involved in the production of pigment. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 125–128 (2000)
54. Stoeckenius W.: The rhodopsin-like pigments of halobacteria: light-energy and signal transduction in an archaeobacterium. *Trends Biochem. Sci.* **10**: 483–486 (1985)
55. Tian B., Sun Z., Shen S., Wang H., Jiao J., Wang L., Hu Y., Hua Y.: Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Let. Appl. Microbiol.* **49**, 689–694 (2009)
56. Tracewell C.A., Vrettos J.S., Bautista J.A., Frank H.A. and Brudvig G.W.: Carotenoid photooxidation in photosystem II. *Archives Biochem. Biophys.* **1**, 61–69 (2001)
57. Ueda T., Ideguchi T., Kaino N., Kakuno T., Yamashita J., Horio T.: Molecular organization of photochemical reaction complex in chromatophore membrane from *Rhodospirillum rubrum* as detected by immunochemical and proteolytic analyses. *J. Biochem.* **4**, 755–65 (1987)
58. Valeru S.P. Rompikuntal P.K., Ishokawa T., Vaitkevicius K., Sjolting A., Dolganov N., Zhu J., Schoolnik G., Wai S.N.: Role of melanin pigment in expression of *Vibrio cholerae* virulence factors. *Infect. Immun.*, **77**, 935–942 (2009)
59. Wakamatsu K., Ito S.: Advanced chemical methods in melanin pigment determination. *Pigment Cell Res.* **15**, 174–183 (2002)
60. Weiner R.M.: Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol.* **15**, 390–394 (1997)
61. Yahir T.L., Parsek M.R.: *Pseudomonas aeruginosa* (w) The Prokaryotes, tom 6, 3. wydanie, red. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H., E. Stackebrandt, Springer Science + Media LLC, New York, NY, USA, 2006, s. 704

Dorota Plewik<sup>1\*</sup>, Maria Koziol-Montewka<sup>1</sup>

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
ul. Chodźki 1, 20-059 Lublin

Wpłynęło w marcu 2010 r.

1. Wstęp. 2. Budowa i szlak aktywacji. 3. Funkcja TLR. 4. TLR w zakażeniach grzybiczych. 5. Polimorfizm genów *TLR*. 6. Wnioski

### Toll-like receptor participation in fungal infections

**Abstract:** Immune system dysfunction is the major risk factor for developing invasive fungal infection. Toll Like Receptors (TLR) are present on cells of the immune system as well as on other cells localized at sites that can potentially be portals of entry for pathogens. TLRs recognize a number of fungal structures and play an important role in the immune response against fungal pathogens. The receptor-ligand binding triggers protein cascade, translocation of NF- $\kappa$ B into the cell nucleus and activation of target genes. Receptors' activation induces the production of some proinflammatory factors, and the activation of innate and adaptive immune responses. Among the discovered 13 different TLRs, fungal ligands are specifically recognized by TLR2, 4 and 9. Scientific research of the recent years confirm the relationship between TLR gene polymorphism in humans and susceptibility to invasive fungal infections.

1. Introduction. 2. Structure and activation pathway. 3. Function of TLRs. 4. TLR in fungal infections. 5. Polymorphisms in *TLR* genes. 6. Conclusions

**Słowa kluczowe:** grzyby, polimorfizm genów, receptory Toll-like

**Key words:** fungus, genes polymorphism, Toll-like receptors

## 1. Wstęp

Receptory Toll-like (TLR) po raz pierwszy wykryto u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), kolejne badania wykazały, że bardzo podobne receptory występują u ssaków, tej zbieżności budowy zawdzięczają swoją nazwę. Występowanie tego mechanizmu immunologicznego u tak odległych ewolucyjnie organizmów świadczy o jego skuteczności w obronie przed inwazją drobnoustrojów. Receptory Toll-like należą do grupy receptorów PRR (pattern recognition receptors) nazywanych receptorami rozpoznającymi wzorce. Ligandami dla nich są cząsteczki PAMP (pathogen associated molecular patterns) – wzorce molekularne związane z patogenami. Są to substancje niezbędne do przeżycia i charakterystyczne dla całych grup drobnoustrojów [2]. U ludzi znane jest 13 różnych receptorów TLR oznaczonych kolejnymi numerami od 1 do 13. Ligandem dla TLR1 są bakteryjne tri-acyl lipopeptydy, dla TLR2 peptydoglikan, lipopeptydy, kwas lipotejchowy, poryny, nietypowy lipopolisacharyd, fosfolipomannan, dla TLR3 dwuniciowe RNA, dla TLR4 lipopolisacharyd, mannany, białka otoczek wirusów, HSP 60 i HSP 70, a dla TLR5 – flagellina. Natomiast dla TLR6 ligandami są diacetylowane lipopeptydy i kwas teichojowy. Receptory TLR7 i TLR8 wiążą ssRNA, zaś niemetylowane oligonukleotydy CpG i he-

mozoina są rozpoznawane przez TLR9. Poszczególne receptory mogą się łączyć i w postaci heterodimerów rozpoznawać inne ligandy, np. zymosan jest wiązany tylko przez połączone receptory TLR2 i TLR6. TLR występują na powierzchni komórek układu odpornościowego monocytach/makrofagach, komórkach tucznych, limfocytach B, limfocytach T, komórkach dendrytycznych, komórkach nabłonkowych skóry, przewodu pokarmowego, układu oddechowego, narządów moczowo-płciowych, adypocytach, komórkach śródbłonna, kardiomiocytach i fibroblastach [10, 17, 18]. Znane są również receptory Toll-like funkcjonujące wewnątrzkomórkowo, przykładem są TLR9 obecny w fagolizosomach. Aktywują je ligandy uwolnione podczas fagocytozy [10].

## 2. Budowa i szlak aktywacji

Część zewnątrzkomórkowa TLR zawiera domeny bogate w leucynę, natomiast wewnątrzkomórkowa domenę TIR (Toll/IL-1R), która wykazuje znaczną homologię z receptorem typu 1 interleukiny 1. Struktura ta powszechnie występuje w komórkach roślin i zwierząt; białka posiadające domenę TIR to, poza receptorami TLR i receptorami dla IL-1, między innymi białka indukujące ekspresję antybiotyków peptydowych

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-059 Lublin; tel/fax (81) 74223781 lub tel 509228295; e-mail: dorotaplewik@yahoo.pl

u lnu, tytoniu i muszek owocowych. Związanie ligandu z receptorem TLR uruchamia wewnątrz komórki kaskadę białek, następnie przyłączenie i aktywacja kolejnych elementów szlaku. Sygnał z aktywowanego TLR jest przekazywany przez kompleksy białkowe. Pierwszy kompleks zawierający aktywowany TLR, molekułą łączącą MyD88 (myeloid differentiation primary response) i kinazę IRAK (kinaza związana z receptorem interleukiny), gromadzi się wokół receptora w odpowiedzi na sygnał. Ten kompleks aktywuje kolejny kompleks, następuje fosforylacja, ubikwitynacja i degradacja białka inhibitorowego I $\kappa$ B. Uwolniony NF- $\kappa$ B przemieszcza się do jądra komórkowego i aktywuje docelowe geny. Kodują one cytokiny prozapalne, chemokiny, receptory immunologiczne, cząsteczki adhezyjne związane z powierzchnią komórki. Mediatorzy zapalne pobudzają drugi szlak sygnałowy, który zwrotnie aktywuje NF- $\kappa$ B [1, 15].

### 3. Funkcja TLR

Receptory TLR znajdują się między innymi na powierzchni komórek nabłonkowych dróg oddechowych i jelit oraz komórkach śródbłonka, dzięki takiej lokalizacji drobnoustroje mogą być rozpoznawane już we wrotach zakażenia. Aktywowane komórki nabłonka wydzielają cytokiny, chemokiny i defensyny, dzięki czemu już na tym etapie zakażenie może zostać powstrzymane. Jeśli komórki nabłonka nie powstrzymają inwazji drobnoustrojów, walkę z nimi podejmują komórki układu odpornościowego [10]

Czynniki wydzielane przez komórki nabłonka przyciągają i wstępnie aktywują leukocyty. Monocyty/makrofagi posiadają wszystkie znane receptory TLR poza TLR3. Związanie przez receptor Toll-like struktury drobnoustroju będącej ligandem, prowadzi do aktywacji komórki. Rozpoczynają one wytwarzanie cytokin prozapalnych: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF, zwiększa się zdolność komórek do fagocytozy, wytwarzania reaktywnych form tlenu, wydzielania NO i prezentacji antygenów limfocytom T [17].

Ekspresja receptorów TLR w komórkach dendrytycznych jest zależna od populacji i dojrzałości komórek. Szpikowe komórki dendrytyczne krążące we krwi posiadają TLR1, 2, 4, 5 i 8, natomiast w populacji plazmatycznych komórek dendrytycznych obecne są wyłącznie TLR7 i TLR8. Ekspresja TLR1, 2, 4 i 5 występuje na niedojrzałych komórkach, spada natomiast w komórkach dojrzałych. Przeciwnie TLR3 jest obecny tylko w komórkach dojrzałych. Połączenie ligandu z receptorem Toll-like powoduje natychmiastową aktywację i dojrzewanie komórki dendrytycznej. Przechodzi ona z tkanek do węzła chłonnego, rozpoczyna wytwarzanie TNF, IL-12, IL-18 i innych cytokin, staje się

również komórką prezentującą antygeny. Aktywacja komórek dendrytycznych prowadzi do zapoczątkowania swoistej odpowiedzi immunologicznej [13, 21]

Wyjątkowo obficie receptory TLR występują na powierzchni komórek tucznych. Wydaje się, że główną rolą tych komórek jest wzmocnienie początkowych sygnałów o inwazji drobnoustrojów. Temu zadaniu sprzyja umiejscowienie ich w rejonach organizmu mogących stanowić wrota zakażenia: w pobliżu naczyń krwionośnych, skórze, błonie śluzowej dróg oddechowych i przewodu pokarmowego, narządów moczowo-płciowych. Na powierzchni komórek tucznych obecne są TLR2, 4, 6 i 8. Po aktywacji wywołanej związaniem ligandu z receptorami TLR mastocyty wydzielają szereg mediatorów prozapalnych, co powoduje zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych, napływ przeciwciał, składników dopełniacza i komórek układu immunologicznego oraz ich aktywację. Dodatkowo komórki tuczne mają zdolność prezentowania antygenów [12].

### 4. TLR w zakażeniach grzybiczych

Wszelkie stany chorobowe oraz procedury diagnostyczne i lecznicze prowadzące do zachwiania równowagi immunologicznej pacjenta predysponują do występowania grzybic. Rozwój chirurgii w tym transplantologii, procedur leczenia nowotworów prowadzących do głębokiej immunosupresji pacjenta oraz powszechne stosowanie antybiotyków, szczególnie o szerokim spektrum działania, spowodował wzrost liczby zachorowań na grzybice [8]. Receptory TLR2, TLR4 oraz TLR9 odgrywają istotną rolę w rozpoznawaniu zakażeń grzybiczych. Choć nie są dokładnie określone elementy komórki grzybów stanowiące ligandy dla TLR, receptory te samodzielnie oraz w połączeniu z receptorami lektynowymi biorą udział w odpowiedzi na zakażenia *Candida* sp., *Aspergillus* sp. oraz *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jiroveci*, *Coccidioides posadasii*, *Paracoccidides brasiliensis* [4, 7, 14, 16, 22].

Interakcja *Candida albicans* z receptorami gospodarza jest kluczowym czynnikiem w patogenezie candidemii. Rozpoznanie różnych morfologicznie form *C. albicans* przez TLR i inne receptory znajdujące się na powierzchni monocytów, makrofagów i komórek dendrytycznych decyduje o polaryzacji odpowiedzi immunologicznej i zachowaniu równowagi w produkcji prozapalnych i przeciwzapalnych cytokin [9]. Pobudzenie TLR4 wzmacnia produkcję chemokin i aktywuje neutrofile, TLR2 pobudza proliferację komórek T regulatorowych, co hamuje rozwój stanu zapalnego, natomiast aktywacja TLR9 prowadzi do wytwarzania cytokin [20].

W rozpoznawaniu zakażeń wywołanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* biorą udział głównie receptory TLR2, TLR4 i TLR9, nadal nie są dokładnie określone struktury PAMP (pathogen associated molecular patterns – cząsteczki – wzorce molekularne związane z patogenami) rozpoznawane przez receptory. Z badań przeprowadzonych na zwierzętach wynika, że zmiana postaci morfologicznej grzyba z konidiów na strzępki powodują modulację odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Receptory TLR4, znajdujące się na powierzchni monocytów, rozpoznają konidia *Aspergillus fumigatus* i aktywują odpowiedź zapalną. Jednak kiełkowanie grzybów i tworzenie strzępek powoduje, że TLR4 nie przekazuje sygnału pobudzającego układ immunologiczny, natomiast TLR2 aktywuje wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, co może być mechanizmem chroniącym grzyby *Aspergillus* sp. przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza [14].

## 5. Polimorfizm genów *TLR*

Chantal i wsp. [6] przeprowadzili badania w których oceniali zależność między polimorfizmem genów *TLR4* a występowaniem zakażeń krwi u ludzi wywołanych przez *Candida*. U pacjentów z polimorfizmem *TLR4* Asp299Gly zaobserwowano wyższą podatność na candidemie. Jednocześnie komórki jednojądrzaste krwi, pochodzące od pacjentów z tym rodzajem polimorfizmu, po stymulacji antygenami *Candida* wytwarzały więcej IL-10. Wyniki badań sugerują, że wyższa zachorowalność na zakażenia krwi wywołane przez *Candida*, u pacjentów z polimorfizmem *TLR4*, związana jest ze zwiększoną produkcją przeciwzapalnej IL-10, hamującej odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciw grzybom. Nie zaobserwowano natomiast zależności pomiędzy polimorfizmem *TLR4* Asp299Gly lub TLR2 Arg677Trp a występowaniem u pacjentów przewlekłej candidemii śluzówek i skóry [19].

Ze względu na zwiększającą się liczbę pacjentów z zaburzeniami odporności narasta problem oportunistycznych zakażeń wywołanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Na inwazyjne zakażenia grzybicze (IZG) wywołane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* sp. szczególnie narażeni są pacjenci leczeni z powodu schorzeń onkohematologicznych, takich jak białaczki i chłoniaki oraz poddawani procedurze przeszczepienia komórek macierzystych. Badania przeprowadzone przez Kesh i wsp. [11] wykazały zależność między częstością występowania inwazyjnej aspergilozy, u pacjentów po przeszczepach komórek macierzystych, a polimorfizmem genów *TLR*. Obecność polimorfizmu Arg80Thr (*TLR1*) lub występowanie jednocześnie polimorfizmu Asn248Ser (*TLR1*) i Ser249Pro (*TLR6*)

u biorcy związane jest z wzrostem ryzyka wystąpienia inwazyjnej aspergilozy po przeszczepie.

Zależność między polimorfizmem genu *TLR4* u dawców komórek krwiotwórczych i występowaniem inwazyjnej aspergilozy u biorców przeszczepów wykazali w swoich badaniach Bochud i wsp. [3]. Obecność haplotypu S4 *TLR4* u dawcy przeszczepu komórek krwiotwórczych zwiększa ryzyko wystąpienia inwazyjnej aspergilozy u niespokrewnionego biorcy. Zależność taka nie występuje w przypadku przeszczepów od spokrewnionych dawców, nie jest znana przyczyna tego zjawiska, możliwe że jest to związane z głębszą immunosupresją pacjentów, u których przeprowadza się przeszczep od niespokrewnionego dawcy. Haplotyp S4 *TLR4* u biorcy przeszczepu nie zwiększa ryzyka wystąpienia inwazyjnej aspergilozy po przeszczepie.

Natomiast Carvalho i wsp. [5] przeprowadzili badania nad zależnością pomiędzy polimorfizmem genów *TLR*, a częstością występowania różnych form nieinwazyjnej aspergilozy płuc. U pacjentów z przewlekłą jamistą aspergilozą płuc zaobserwowana częstsze występowanie allelu G na Asp229Gly (*TLR4*) niż w grupie kontrolnej. Natomiast wzrost częstości zachorowań na alergiczną oskrzelowopłucną aspergilozę był związany z obecnością allelu C na T-1237C (*TLR9*). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy polimorfizmem w obrębie genów TLR2, TLR4 i TLR9, a częstością występowania ciężkiej astmy z uczuleniem na grzyby [5].

## 6. Wnioski

Receptory Toll-like biorą udział w odpowiedzi immunologicznej na zakażenia wywołane przez wiele grzybów chorobotwórczych dla człowieka. Określenie roli poszczególnych TLR wymaga dalszych badań zarówno na modelach zwierzęcych, jak i oceny polimorfizmu genów kodujących poszczególne białka biorące udział w szlaku przekazywaniu sygnałów przez TLR u ludzi. Zrozumienie interakcji między grzybami a układem immunologicznym, w tym receptorami Toll-like, może w przyszłości zaowocować opracowaniem nowych strategii leczenia i leków przeciwgrzybiczych.

## Piśmiennictwo

1. Anderson K.: Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current Opinion in Immunology*, **12**, 13–19 (2000)
2. Belvin M., Anderson K.: A Conserved Signaling Pathway: The *Drosophila* Toll-Dorsal Pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 393–416 (1996)
3. Bochud P., Chien J., Marr K., Leisenring W., Upton A., Janer M., Rodrigues S., Li S., Hansen J., Zhao L., Aderem A.,

- Boeckh M. Toll-like Receptor 4 Polimorphisms and Aspergillosis in Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **23**, 1766–1777 (2008)
4. Calich V., Pina A., Felonato M., Bernardino S., Costa S., Loures F. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**, 1–7 (2008)
  5. Carvalho A., Pasqualotto A., Pitzurra L., Romani L., Denning D., Rodrigues F. Polimorphisms in Toll-Like Receptor and Susceptibility to Pulmonary Aspergillosis. *J. Inf. Dis.* **197**, 618–621 (2008)
  6. Chantal A., Van der Graaf, Netea M., Morre S., Heijer M., Verweij P., Van der Meer J., Kullberg B. Toll-like receptor 4 AspGly/Thr399Ile polymorphisms are risk factor for Candida bloodstream infection. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 29–34 (2006)
  7. Ding K., Shibui A., Wang Y., Takamoto M., Matsuguchi T., Sugane K.: Impaired recognition by Toll-like receptor 4 responsible for exacerbated murine Pneumocystis pneumonia. *Microbes and Infection*, **7**, 195–203 (2005)
  8. Dzierżanowska D.: Zakażenia szpitalne. Alfa-Medica Press Bielsko-Biała 2008, s. 409
  9. Filler S. Candida-host cell receptor-ligand interactions *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 333–339 (2006)
  10. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek., Stokłosa T. (Red.): Immunologia. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2009, s. 80–89
  11. Kesh S., Mensah N., Peterlongo P., Jaffe D., Hsu K., Van den Brink M., O'Reilly R., Pamer E., Satagopan J., Papanicolaou G. TLR1 and TLR6 Polymorphism Are Associated with Susceptibility to Invasive Aspergillosis after Allogeneic cell Transplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1062**, 95–103 (2005)
  12. Kirshenbaum AS., Swindle E., Kulka M., Wu Y., Metcalfe DD.: Effect of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on human mast cell numbers, cytokine production, and protease composition. *BMC Immunol.* **7**, 9–45(2008)
  13. Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco LP., Allavena P., Mantovani A.: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* **164**, 5998–6004 (2000)
  14. Netea M., Van der Meer J., Kullberg B.: Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Immunology of Fungal Infections*. red. Brown G., Netea M., Springer, Dordrecht 2007 s. 259–272
  15. Li X., Stark G.: NF $\kappa$ B-dependent signaling pathways. *Exp. Hematol.* **30**, 285–296 (2002)
  16. Shoham S., Huang C., Chen J., Golenbock D., Levitz S.: Toll-Like Receptor 4 Mediates Intracellular Signaling Without TNF- $\alpha$  Release in Response to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide Capsule. *J. Immunol.* **166**, 4620–4626 (2001)
  17. Tekada K., Kaisho T., Akira S.: Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–76 (2003)
  18. Uematsu S., Akira S.: Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.* **84**, 712–725 (2006)
  19. Van der Graaf C.A., Netea M.G., Drenth I.P., te Morsche R.H., van der Meer JW, Kullberg BJ. Candida-specific interferon-gamma deficiency and toll-like receptor polymorphisms in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Neth. J. Med.* **61** (11), 365–369 (2003)
  20. Van de Veerdonk F., Netea M., Jansen T., Jacobs L., Verschueren I., Van der Meer J., Kullberg B.: Redundant role of TLR9 for anti-Candida host defense. *Immunobiology*, **213**, 613–620 (2008)
  21. Van Kooten C., Fiore N., Trouw L.A., Csomor E., Xu W., Castellano G., Daha M.R., Gelderman K.A.: Complement production and regulation by dendritic cells: molecular switches between tolerance and immunity. *Mol. Immunol.* **45**, 4064–4072 (2008)
  22. Viriyakosol S., Fierer J., Brown G., Kirkland T.: Innate Immunity to the Pathogenic Fungus *Coccidioides Posadasii* Is Dependent on Toll-Like Receptor 2 and Dectin-1. *Infect. Immun.* **73**, 1553–1560 (2005)

# MECHANIZMY OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI WYKRYWANE U BAKTERII Z RODZAJU *CORYNEBACTERIUM*

Alina M. Olender\*

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Wpłynęło w grudniu 2009 r.

1. Wstęp. 2. Problemy oznaczania oporności na antybiotyki i sposobie interpretacji. 3. Mechanizmy oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki wykrywane u *Corynebacterium* spp. 3.1. Oporność na antybiotyki beta-laktamowe. 3.2. Oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B. 3.3. Oporność na fluorochinolony. 3.4. Oporność na tetracykliny. 3.5. Oporność na glikopeptydy. 3.6. Oporność na chloramfenikol. 3.7. Oporność na aminoglikozydy. 4. Wrażliwość na antybiotyki gatunków z rodzaju *Corynebacterium* najczęściej izolowanych z zakażeń. 5. Podsumowanie

## Mechanisms of resistance to antibiotics in the species of the genus *Corynebacterium*

**Abstract:** In recent years, opportunistic species of the genus *Corynebacterium*, such as *C. jeikeium*, *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. striatum* and others, are becoming increasingly important to humans. The difficulties in the diagnosis of infections caused by these microorganisms are due to their presence on the skin and mucous membranes, which raises the possibility of contamination of the taken material, so that the real participation of these species in infections is underestimated. An additional problem in the application of effective antibiotic therapy is the lack of uniform rules for the assessment of antibiotic resistance. The possibility of determining the MIC by means of Etests, giving high correlation results with the dilution method and establishing the criteria for the interpretation of *Corynebacterium* sp., made it possible to standardize the methods for assessment of antibiotics resistance which are used in the treatment of infections produced by coryneform. The description of multidrug-resistant isolates of opportunistic strains of the genus *Corynebacterium* and genetic studies have highlighted the different mechanisms of resistance and confirmed the presence of responsible genes. Among detected mechanisms, the most significant is MLSB resistance to makrolides and linkozamides, streptogramins B (genes *ermX*, *ermA*, *ermB*, *msrA*, *mef*), quinolones (gene *gyrA* mutation), tetracyclines (*tetA*, *tetB*) and chloramphenicol (*cmx*). Moreover, the reports of glycopeptides resistance (van A) detection are extremely worrying. Based on the analysis of the sensitivity of resistant strains to antibiotics, it can be concluded that the most effective in the treatment of infections caused by *Corynebacterium* sp. are: vancomycin, teicoplanin, linezolid, daptomycin, quinupristin/dalfopristin, since they show the highest performance.

1. Introduction. 2. Problems in the determination of resistance to antibiotics and the way of their interpretation. 3. Mechanisms of resistance to antibiotics found in *Corynebacterium*. 3.1. Resistance to beta-lactam antibiotics. 3.2. Resistance to macrolides, linkozamides, streptogramins B. 3.3. Resistance to quinolones. 3.4. Resistance to tetracyclines. 3.5. Resistance to glycopeptides. 3.6. Resistance to chloramphenicol. 3.7. Resistance to aminoglycosides. 4. Sensitivity to antibiotics in the species of the genus *Corynebacterium* most frequently isolated from infections. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** *Corynebacterium*, coryneform, mechanizmy oporności na antybiotyki, geny

**Key words:** *Corynebacterium*, coryneform, mechanisms of antibiotics resistance, genes

## 1. Wstęp

Rodzaj *Corynebacterium* obejmuje gatunki o różnicowanym znaczeniu chorobotwórczym. Od typowo patogenego dla ludzi *C. diphtheriae* [61], którego lizogenne szczepy wytwarzające toksynę są czynnikiem etiologicznym błonicy, czy patogenych dla zwierząt *C. pseudotuberculosis* [4, 13], *C. kutscheri* [2], *C. auriscanis* [9] oraz powodujących zakażenia oportunistyczne u ludzi i wchodzących w skład flory fizjologicznej *C. jeikeium* [37, 42], *C. urealyticum* [20, 21], *C. amycolatum* [1, 11, 20], *C. striatum* [7, 20, 32, 35, 40], *C. pseudodiphtheriticum* [8, 16], do nie wywołujących zakażeń takich jak *C. pseudogenitalium* [20] – również składnika mikroflory.

Do rodzaju *Corynebacterium* należą również gatunki niezwiązane z człowiekiem np.: wytwarzający kwas L-glutaminowy i lizynę *C. glutamicum*, wykorzystywany w procesach biotechnologicznych na skalę przemysłową i badaniach genetycznych [27, 46, 55, 59, 63, 66, 68].

W ostatnich latach pojawiły się liczne publikacje, których autorzy opisują przypadki zakażeń wywołanych przez oportunistyczne *Corynebacterium* spp. Przeprowadzone badania genetyczne izolowanych szczepów doprowadziły do wykrycia nowych gatunków takich jak: *C. singulare* [39], *C. auriscanis* [9], *C. resistens* [34], *C. imitans* [18], *C. sputi* [67] oraz reklasyfikację identyfikowanych wcześniej np.: *C. cystidis*, *C. pilosum* [49].

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel.: 081 742 37 84; e-mail: a.olender@umlub.pl

Stwierdzana coraz większa liczba zakażeń i duże różnicowanie gatunków w obrębie *Corynebacterium* spp. oraz pokrewnych rodzajów np.: *Turicella*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* o podobnych cechach morfologicznych, spowodowało pilną potrzebę prowadzenia szczegółowych badań w zakresie ich identyfikacji i taksonomii. W związku z tym, tradycyjnie używana nazwa, także w języku polskim „dyfteroidy”, która sugeruje bezpośredni związek z *C. diphtheriae*, coraz częściej jest zastępowana przez systematyków bardziej uniwersalną nazwą „coryneform” [1, 5, 19, 20, 22, 29, 34], co wydaje się w pełni uzasadnione.

Gatunki oportunistyczne zaliczane do rodzaju *Corynebacterium* należą do drobnoustrojów, które w ostatnich latach nabierają coraz większego znaczenia w zakażeniach u ludzi [1, 7, 11, 17, 18, 34, 35]. Wiele szczepów izolowanych z materiałów klinicznych, należy do grup taksonomicznych, których cechy patogene nie zostało jeszcze dokładnie scharakteryzowane a ocena ich roli jako drobnoustrojów chorobotwórczych jest trudna. Dodatkowym utrudnieniem jest panująca niekiedy opinia o traktowaniu oportunistycznych coryneform jako zanieczyszczeń hodowli, co jest związane z ich bardzo częstym występowaniem na skórze i błonach śluzowych.

Obserwowany wzrost przypadków zakażeń wywołanych przez oportunistyczne *Corynebacterium* spp. wynika zapewne z wyższego poziomu diagnostyki mikrobiologicznej – opracowania komercyjnych zestawów do ich identyfikacji oraz stosowania metod biologii molekularnej do identyfikacji trudnych i badania nowo poznawanych gatunków.

Do grupy chorych szczególnego ryzyka, u których coryneform mogą powodować zakażenia, należą przede wszystkim osoby z obniżoną odpornością z powodu toczącego się procesu nowotworowego, zaburzeniami czynności szpiku kostnego, po zabiegach chirurgicznych, urologicznych, inwazyjnych badaniach diagnostycznych oraz chorzy na AIDS. Dodatkowym ryzykiem jest długotrwała hospitalizacja, antybiotykoterapia, radioterapia, leczenie cytotatykami i sterydami. Niepokojącym faktem jest obserwowany wzrost tego typu zakażeń u pacjentów, tzw. „immunokompetentnych”, u których nie stwierdzano wcześniej objawów obniżenia odporności [8, 16].

Utrudnieniem w diagnostyce mikrobiologicznej zakażeń wywołanych przez *Corynebacterium* spp. jest brak jednolitych zasad wykonywania oznaczeń oporności na antybiotyki, co jest podstawą efektywnej antybiotykoterapii. Przedstawiane przez wielu autorów wyniki badań charakteryzujące oporność na antybiotyki różnych gatunków izolowanych z materiałów klinicznych oparte były przede wszystkim na badaniach fenotypowych. Były one prowadzone w różnych

ośrodkach za pomocą różnych metod i różnych interpretacji. Z tego powodu wyniki te nie zawsze mogą być porównywalne, niemniej jednak stały się podstawą do informacji o występowaniu wśród *Corynebacterium* spp. szczepów wykazujących wysoką oporność na antybiotyki, dla których antybiotykiem z wyboru skutecznie działającym jest wankomycyna.

Prowadzone od lat 80. XX wieku badania genów oporności występujących u *Corynebacterium* spp. zwróciły uwagę na możliwe mechanizmy ich przeniesienia oraz podobieństwo do genów występujących u innych drobnoustrojów np.: pałeczek *E. coli* [12, 45, 46], *Staphylococcus* spp. [41], *Enterococcus* spp. [38]. Są to nieliczne doniesienia, które nie podają obszernych informacji na temat genów oporności występujących u *Corynebacterium* spp.

## 2. Problemy oznaczania oporności na antybiotyki i sposobie interpretacji

Gatunki z rodzaju *Corynebacterium* wykazują różne zapotrzebowanie na składniki niezbędne do wzrostu (lipidy). Powszechnie stosowanym podłożem jest Columbia Agar z 5% krwią owczą oraz agar tryptozowo-sojowym z dodatkiem 5% krwi owczej i jej lizatu [34], lub lizatu 3,0; 4,5; 5,0% krwi końskiej [18, 34, 35, 42]. Gatunki lipofilne np.: *C. jeikeium* czy *C. urealyticum*, wykazują szybszy wzrost na podłożu z dodatkiem Tween 80, który używany jest w różnych stężeniach od 0,2 do 1,0% [21], lub zamiennie z 6,6% surowicą króliczą [58]. Prowadzone są również hodowle *Corynebacterium* spp. w płynnych podłożach – bulionie mózgowo-sercowy z 0,2% Tween 80 i ekstraktem drożdżowym (0,4%) [42]. Ze względu na stymulację wzrostu coryneform przez Tween 80, krytykowane jest jego dodawanie do podłoża służących do oznaczania lekooporności [29]. Natomiast znacznie ułatwia izolację coryneform dodanie do podłoża fosfomycyny, która hamuje wzrost innych bakterii [21].

W związku z brakiem zaleceń do wykonania badań i interpretacji oporności na antybiotyki dla *Corynebacterium* spp. używane były różne metody a sposoby ich interpretacji stosowano takie jak dla innych grup bakterii Gram-dodatnich: *Staphylococcus* spp. [26], *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. [21], paciorkowców zieleniejących [7]. Dla penicyliny i ampicyliny stosowano interpretację, jak dla *Listeria monocytogenes*, a dla wankomycyny taką jak dla grupy innych Gram-dodatnich, ale nie enterokoków [32]. Do wykrywania aktywności beta-laktamaz wykorzystywano metodę acydometryczną [35] opisywaną przez Tu i wsp. [57]. Przy oznaczaniu oporności na antybiotyki beta-laktamowe coryneform – *Brevibacterium casei*, *Der-*



*mabacter hominis* i *Turacella otidis* zastosowano kryteria takie jak dla *Enterobacteriaceae* [56].

Metoda dyfuzyjno-krażkowa jest często stosowana do oznaczania wrażliwości na antybiotyki wielu rodzajów bakterii. W przypadku coryneform jest często wykorzystywana do badania oporności różnych gatunków, ale brak zasad interpretacji dla *Corynebacterium* spp. podważa jej wiarygodność. Kryteria interpretacji stref zahamowania wzrostu przyjmowane są takie jak dla różnych Gram-dodatnich bakterii.

Do oznaczania lekooporności najczęściej używany jest Mueller-Hinton Agar lub Columbia Agar z dodatkiem 5% krwi owczej i inokulum w 0,85% NaCl o gęstości 0,5 lub 1,0 wg skali McFarlanda. Inkubacja przeprowadzana jest w temperaturze 35°C przez 18–24 godz., w atmosferze CO<sub>2</sub> lub bez niego [21, 32].

Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie lub Mueller-Hinton Agar, z dodatkiem 3,0; 4,5 lub 5% lizatu krwi końskiej [22, 34, 35] i zawiesiny bakterii o gęstości 0,5 w skali McFarlanda [18, 32] jest najczęściej wykorzystywana w pracach, w których oznaczano wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration) *Corynebacterium* spp. Inkubacja przeprowadzana jest w warunkach tlenowych w temperaturze 35°C przez 20–24, lub 48 godzin [18, 34, 35, 42].

W badaniach lekooporności coryneform wykorzystywano również metodę mikrorozcieńczeń stosowaną dla *Staphylococcus* – ATB Staph5 (bioMérieux) [65].

Metoda z użyciem Etest (AB BIODISK) jest bardzo dokładną i wygodną w oznaczaniu wrażliwości na antybiotyki u *Corynebacterium* spp., tym bardziej, że istnieją ustalone kryteria interpretacji wartości MIC dla tej grupy bakterii [62]. Do wykonania oznaczenia powinien być zastosowany Mueller-Hinton Agar z dodatkiem 5% krwi owczej, inokulum 1 wg skali McFarlanda w bulionie i prowadzona inkubacja w 35°C w atmosferze tlenowej lub z 5% CO<sub>2</sub> (jeśli jest to wymagane do lepszego wzrostu badanego szczepu, ale nie w przypadku erytromycyny i klindamycyny) przez 24–48 godz. lub dłużej – jeżeli szczep jest wolnorosnący. Odczytana wartości MIC na pasku Etest powinna odpowiadać całkowitemu zahamowaniu wzrostu, obejmującemu również mikrokolonie i wzrost mgławicowy. Dla antybiotyków bakteriostatycznych przy widocznym wzroście mgławicowym należy odczytać MIC w punkcie 80% jego zahamowania. Jako szczep kontrolny powinien być użyty *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

W wielu pracach autorzy wykonali oznaczenie wrażliwości na antybiotyki *Corynebacterium* spp. za pomocą metody z użyciem Etest [15, 17, 48, 65], co dawało bardzo dobrą porównywalność wyników i wysoką ich korelację z uzyskanymi metodą mikrorozcieńczeń w bulionie.

### 3. Mechanizmy oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki wykrywane u *Corynebacterium* spp.

Problemem w leczeniu zakażeń wywołanych przez gatunki z rodzaju *Corynebacterium* jest izolacja szczepów o wysokiej oporności na antybiotyki. Informacje te oparte są przede wszystkim na badaniach fenotypowych, w których dokładnie scharakteryzowano izolaty pochodzące z różnych materiałów klinicznych [1, 17, 19–22, 32, 35, 40].

Od lat 70. do wczesnych lat 80. XX wieku prowadzone były badania nad pozachromosomalnymi elementami genetycznymi zarówno u patogennych, jak i niepatogennych szczepów *Corynebacterium* spp. [23, 28, 64]. Od tego czasu została wykryta duża liczba plazmidów, z pośród których duże plazmidy pochodziły głównie z gatunków potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka, małe natomiast z *Corynebacterium* spp. występujących w glebie. Geny oporności na antybiotyki najczęściej zlokalizowane są na dużych plazmidach np.: oporność na tetracyklinę, chloramfenikol, erytromycynę, streptomycynę na plazmidzie pTP10 u *C. xerosis* [12, 25].

Opisywane wielolekooporne szczepy *C. jeikeium* [42, 66] *C. amycolatum* [66], *C. striatum* [7, 32, 35, 40] i *C. resistens* [34] potwierdzają występowanie u *Corynebacterium* spp. różnych mechanizmów oporności i genów o różnej lokalizacji.

#### 3.1. Oporność na antybiotyki beta-laktamowe

Penicylina jest jednym z zalecanych antybiotyków w leczeniu błonicy, co wynika z powszechnej wrażliwości toksycznych i nietoksycznych szczepów *C. diphtheriae* na ten antybiotyk [61]. Jednak opisywane były przypadki jej nieskuteczności. Wykonane przez von Hunolstein i wsp. [65] badania wrażliwości na penicylinę 24 nietoksycznych szczepów *C. diphtheriae* biotyp *gravis* metodą mikrorozcieńczeń w bulionie i za pomocą Etest (wyniki obu metod były zgodne w 98%), wykazały MIC dla penicyliny w zakresie 0,064–0,250 mg/l i bardzo niski dla erytromycyny (MIC ≤ 0,016 mg/l). MBC (Minimal Bactericidal Concentration) minimalne stężenie bakteriobójcze MBC<sub>50</sub> i MBC<sub>90</sub> dla penicyliny było 2 i 8 mg/l oraz 17 i 24. 71% badanych szczepów miało stosunek MBC/MIC ≥ 32. Wyniki badań sugerowały tolerancję (niewrażliwość) na penicylinę, co potwierdzał brak pozytywnego efektu leczenia przy wartościach MIC wskazujących na wrażliwość badanych szczepów na ten antybiotyk. Tolerancję na amoksyycynę stwierdzono również u szczepu *C. diphtheriae* izolowanego z przypadku *endocarditis* [14].

Wykryta oporności na oksacylinę u szczepu *Corynebacterium* spp. była związana z wysoką aktywnością obecnych na Tn3598 – transpozonie klasy II – 12 kpz, pary genów *tetA* i *tetB* determinujących oporność na tetracykliny. Aktywność tych genów, polegająca na potężnym czynnym wypompowywaniu, powodowała usuwanie również innego strukturalnie antybiotyku, jakim była oksacylina [53].

Na podstawie analizy wyników badań fenotypowych i genotypowych różnych gatunków rodzaju *Corynebacterium* wykazujących oporność na antybiotyki beta-laktamowe, można sądzić, że występują u tych drobnoustrojów oba mechanizmów oporności tj. wytwarzanie beta-laktamaz i modyfikacja białek wiążących penicylinę. Potwierdza to np.: oporność na penicylinę (MIC<sub>90</sub> >4 µg/ml) u szczepów *C. jeikeium* i *C. urealyticum*, ampicylinę (MIC<sub>90</sub> >8 µg/ml) [22], u *C. resistens* na penicylinę, cefazolinę, cefotiam, cefmetazol, cefepim (MIC >64 µg/ml) i imipenem (MIC >32 µg/ml) [34], u szczepów *C. striatum* na penicylinę, ampicylinę (MIC<sub>90</sub> = 16 µg/ml), cefazolinę, cefotiam, cefotaksim, imipenem (MIC<sub>90</sub> >32 µg/ml) [35]. U szczepów szpitalnych *C. urealyticum* oporność na penicylinę i cefotaksim była szczególnie wysoka (MIC<sub>90</sub> >512 µg/ml) [21].

Analiza sekwencji genomu *C. glutamicum* wykazała obecność czterech genów kodujących białka PBP (Penicillin Binding Proteins) HMW (high-molecular-weight), tj. PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2b, dwóch genów kodujących PBP4, PBP4b (low-molecular-weight) oraz dwóch kodujących prawdopodobnie beta-laktamazy [63].

### 3.2. Oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B

Mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B (MLS<sub>B</sub>) najczęściej występuje u gronkowców. Związany jest z obecnością genów z grupy *erm* (erythromycin ribosome methylation) kodujących enzym metylazę rRNA, która powoduje dimetylację adeniny obecnej w 23S rRNA [3]. Roberts i wsp. [41] zakwalifikowali geny *erm* występujące u *Corynebacterium* spp. do klasy X. Mimo wysokiego stopnia homologii między genami *ermX* izolowanymi z różnych gatunków *Corynebacterium* (*C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. xerosis*) wykazują one inną lokalizację. Gen *ermX* (tj. *ermCd*) *C. diphtheriae* znajduje się w obrębie 14,5-kpz plazmidu pNG2 [10], natomiast gen *ermX* (tj. *ermCX*) *C. xerosis* jest zlokalizowany w obrębie transpozonu Tn5432, którego nośnikiem jest 50-kpz R plazmid pTP10 [11]. U szczepu *C. jeikeium* [37] i *C. striatum* [40] *ermX* występuje na chromosomie co zostało potwierdzone (gen *ermXcj*) również

u innych badanych szczepów *C. jeikeium* [42]. Mimo różnic w wynikach badań u szczepów *C. jeikeium* i *C. xerosis*, gen *ermX* jest głównie łączony z lokalizacją na transpozonie Tn5432. U innych badanych szczepów, u których mechanizm MLS<sub>B</sub> nie jest związany z lokalizacją genów *ermX* na transpozonie Tn5432, stwierdzono, że posiadają one również wszystkie jego części składowe (tj. Tn5432), co wskazuje na późniejszą jego reorganizację [24]. Jest możliwe, że ruchome elementy transpozycyjne IS1249 zawierające *ermX* mogą tworzyć nowe złożone transpozony zawierające inne geny wielolekooporne. Jest to szczególnie niepokojące, ponieważ transpozycja sekwencji insercyjnej IS1249 jest znana z możliwości wstawienia i przeniesienia Tn5432 z genomów bakterii niespokrewnionych [42]. Prace, w których opisywano różną lokalizację wykrytych genów *ermX* dotyczyły gatunków *Corynebacterium*, które izolowane były z różnych rejonów geograficznych. Szczep *C. diphtheriae* zawierający pNG2 i *C. striatum* pochodzący od pacjentów z północno-zachodniej części USA [10, 25, 40], *C. xerosis* z pTP10 z Japonii [51], *C. jeikeium* z Francji [42] i *C. jeikeium* i *C. amycolatum* z Hiszpanii [66].

Rozmieszczenie genów *ermX* sugeruje, że lekooporne szczepy *Corynebacterium* spp. nabywają geny od drobnoustrojów kolonizujących skórę lub błony śluzowe. *ErmCd* jest zawarty w plazmidzie pNG2 podobnym do plazmidów izolowanych od *Corynebacterium* spp. występujących na skórze [44]. Replikon 2.6-kpz EcoRI-ClaI fragment (*oriR*) może posiadać dużo mikroorganizmów, w tym *E. coli* [12, 45, 46].

Plazmid pNG2 wydaje się mało prawdopodobnym miejscem, z którego pochodzą geny *erm* *Corynebacterium* spp. Bardziej prawdopodobnym jest związany z chromosomem transpozon Tn5432, który może być ruchomy [51]. Tn5432 został również wykryty u występujących na skórze szczepów *Propionibacterium acnes*, *P. avidum* i *P. granulosum*, co sugeruje, że wielolekooporne szczepy z rodzaju *Corynebacterium* mogą być ważnym źródłem w horyzontalnym transferze genów oporności do innych drobnoustrojów patogennych dla człowieka [43].

Możliwość przenoszenia genu *ermX* „do” lub „z” gatunków występujących u zwierząt potwierdza fakt, że został on wykryty u szczepu *Corynebacterium* spp. izolowanego z mleka pasteryzowanego. Wykazywał on oporność na erytromycynę i/lub spiromycynę [36].

U szczepów *Corynebacterium* grupy A posiadających mechanizm oporności MLS<sub>B</sub> został wykryty również gen *ermB* [30].

Oporność na makrolidy i streptograminy B u szczepów *Corynebacterium* spp. jest związana również z obecnością genu *msrA* [33] i wytwarzaniem układu aktywnego transportu wypompowywania antybiotyku z komórki (macrolide efflux proteins). Gen *msrA* był

wcześniej wykrywany tylko u *Staphylococcus* spp. [41]. Koduje on przekaźnik ATP potrzebny komórce do uzyskania energii z hydrolizy ATP do aktywnego transportu erytromycyny i streptograminy B i umożliwia syntezę rodziny transporterów ABC, tj. wielobiałkowych systemów do aktywnego wypompowywania antybiotyku z komórki [31].

Gen *mef* powodujący aktywne usuwanie makrolidów z komórki bakteryjnej został wykryty u *S. pneumoniae* i *S. pyogenes* oraz jak wykazał L u n a i wsp. [30] również u *Corynebacterium* grupy A, *C. jeikeium* i innych szczepów *Corynebacterium* spp.

### 3.3. Oporność na fluorochinolony

Oporność na fluorochinolony (norfloksacynę, ciprofloksacynę, lewofloksacynę) została wykryta u szczepów *C. macginleyi* przez E g u c h i i wsp. [15] i jest związana z mutacjami w obrębie obszaru genu strukturalnego podjednostki A gyrazy, który określany jest jako obszar warunkujący oporność na chinolony (QRDR – quinolone resistance determining region) [15, 31]. Poprzez analizę genu *gyrA* kodującego podjednostkę A gyrazy ujawniono zmianę w rejonie QRDR aminokwasu w pozycji 83 (Ser na Arg), co spowodowało wytworzenie u *C. macginleyi* oporności na norfloksacynę. Wykryto także podwójną mutację prowadzącą do zmiany aminokwasów w pozycjach 83 i 87 (Asp na Ala) warunkującą oporność na wszystkie fluorochinolony. U wszystkich szczepów *C. macginleyi* o wysokim poziomie oporności występowały podwójne mutacje w Ser-83 i Asp-87 [15].

Badania sekwencji genu *gyrA* przeprowadzono również u szczepów *C. striatum* i *C. amycolatum* [48]. Wysoka oporność na chinolony u *C. amycolatum* była wynikiem podwójnej mutacji i zmiany aminokwasów w pozycji 87 i 97 lub 87 i 88 (niezwykła lokalizacja w *gyrA*). W *gyrA* *C. striatum* występowały mutacje aminokwasów w pozycji 87 i 91, co odpowiadało oporności (bardzo duże wartości MIC) na ciprofloksacynę i lewofloksacynę, ale jedynie umiarkowanie zwiększonej wartości MIC moxifloksacyny. Badania te wykazały różne zawiłe mechanizmy oporności na chinolony u badanych gatunków *Corynebacterium* spp. [48].

### 3.4. Oporność na tetracykliny

Oporność na tetracykliny u *C. striatum* (97% badanych szczepów) opisywana była przez M a r t i n e z - M a r t i n e z i wsp. [32] w oparciu o przeprowadzone badania fenotypowe. Potwierdziło to wykrycie obecności genu *tetM*, który determinuje oporność na wszystkie tetracykliny i jest związany z ochronnym działaniem na rybosom przez białko o masie około 72–72,5 kDa [40].

U szczepów *C. striatum* M82B oporność na tetracyklinę jest związana z regionem 50-kpz R-plazmidu pTP10. Analiza sekwencji nukleotydów ujawniła dwie ramki odczytu nazwane *tetA* i *tetB*. Do analizy funkcji *tetAB* genów wykorzystano ich ekspresję w *C. glutamicum* i stwierdzono, że są one odpowiedzialne za oporność na tetracyklinę, oksytetracyklinę oraz na niskim poziomie (mniejsze wartości MIC) na inne pochodne: chlorotetracyklinę, minocyklinę, doksycyklinę. Jednocześnie stwierdzono zwiększoną u tego szczepu wartość MIC dla oksacyliny, co może wynikać z działania genów *tetAB*, tj. wytworzenia potężnego mechanizmu czynnego transportu wypompowywania leków z komórki [54].

R plazmid pTP10 obecny u *C. xerosis* zawiera również determinanty oporności na tetracyklinę oraz inne antybiotyki: chloramfenikol, kanamycynę, erytromycynę [28, 52].

U szczepów *C. melassecola*, gatunku używanego do produkcji glutaminianu, gen oporności na tetracyklinę, został wykryty na plazmidzie pAG1 [12, 50].

### 3.5. Oporność na glikopeptydy

Zalecanym przez wielu autorów antybiotykiem w empirycznym leczeniu zakażeń o charakterze inwazyjnym wywołanych przez coryneform jest wankomycyna. Wiąże się to z powszechną wrażliwością na ten antybiotyków nawet wielolekoopornych gatunków takich jak *C. jeikeium*, *C. resistant*, *C. amycolatum*, *C. striatum*. Są jednak doniesienia o izolacji szczepów *Corynebacterium* – *C. aquaticum* i *C.* grupy B1 opornych na wankomycynę [60].

B e r n a s i wsp. [6] opisali przypadek izolacji szczepu *Corynebacterium* spp. opornego na wankomycynę oraz penicylinę G, erytromycynę, gentamycynę i rifampicynę izolowanego od 44-letniego chorego z *endocarditis* 4 miesiące po wymianie protezy zastawki mitralnej. Zastosowanie imipenemu i ciprofloksacyny spowodowało wyleczenie zakażenia.

U pokrewnych gatunków coryneform *Oerskovia turbata* 892 i *Arcanobacterium (Corynebacterium) haemolyticum* 872 stwierdzono oporność na wankomycynę i teikoplaninę o charakterze konstytuowanym. Wykryto obecność genów *van A*, występujących na plazmidach 15 i 20 kpz. U szczepów *A. haemolyticum* 872 sekwencja genu *van A* okazała się taka sama jak u opornego na wankomycynę *Enterococcus faecium* BM4147. W przypadku *O. turbata* 892 występowała w trzech miejscach zmiana sekwencji. *A. haemolyticum* i *O. turbata* wykazują naturalną wrażliwość na wankomycynę i teikoplaninę, stwierdzona oporność u badanych szczepów wynikała z obecności genu *van A* [38].

### 3.6. Oporność na chloramfenikol

Geny oporności na chloramfenikol zostały wykryte na plazmidach – u szczepu *Corynebacterium* spp. na plazmidzie pXZ10145 – 5,3 kpz [68], oraz u *C. xerosis* na pTP10 – 45,0 kpz [12].

Ya u c h i wsp. [55] wykryli u szczepu *C. striatum* M82B (dawniej *C. xerosis* M82B) gen oporności na chloramfenikol *cmx* (chloramphenicol export) jako integralną część transpozonu Tn5564, zawierającego kompletną kopię sekwencji inercyjnej IS1513. Gen *cmx* koduje specyficzne białko (transmembrane chloramfenikol efflux protein) hamujące przechodzenie antybiotyku do cytoplazmy.

### 3.7. Oporność na aminoglikozydy

W 1984 roku Katsumata i wsp. [27] wykryli u szczepu *Corynebacterium* spp. geny oporności na streptomycynę i spektinomycynę zlokalizowane na plazmidzie pCG4. Natomiast gen oporności na kanamycynę u *C. xerosis* M82B stwierdzono na plazmidzie pTP10 [55].

## 4. Wrażliwość na antybiotyki gatunków z rodzaju *Corynebacterium* najczęściej izolowanych z zakażeń

Ze względu na występowanie wielolekoopornych szczepów różnych gatunków z rodzaju *Corynebacterium*, bardzo cenne są wyniki badań charakteryzujące wrażliwość na antybiotyki, które potencjalnie mogą mieć zastosowanie w leczeniu zakażeń.

Fernandez-Roblas i wsp. [17] przeprowadzili ocenę wrażliwości na antybiotyki za pomocą Etest dużej liczby szczepów: *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. coyleae*, *C. striatum*, *C. aurimucosum* i *C. afermentans*. Autorzy stwierdzili, że szczepy wszystkich badanych gatunków były wrażliwe na glikopeptydy, linezolid, chinupristynę/dalfopristynę i daptomycynę, co potwierdzili Funke i wsp. [19, 20].

Przeprowadzone we Włoszech badania genetyczne szczepów *C. striatum* MDR (multidrug-resistant), ujawniły występowanie lekoopornego klonu, którego szczepu izolowano z przypadków zapalenia płuc, odcewnikowej bakteriemii i zakażeń ran. Wykazywały one wrażliwość na glikopeptydy, tigeocyklinę, chinupristynę/dalfopristynę, daptomycynę i linezolid, przy oporności na inne grupy antybiotyków [7].

Jednym z najbardziej opornych gatunków izolowanych ze środowiska szpitalnego jest *C. jeikeium*. Przeprowadzone badania przez Johnson i wsp. [26] 66 szczepów *C. jeikeium* wykazały u wszystkich oporność na penicylinę, u 94% oporność na erytromycynę,

74% na tetracyklinę. 22 szczepy innych badanych gatunków z rodzaju *Corynebacterium* miały zdecydowanie niższy odsetek opornych. Natomiast wszystkie objęte badaniem szczepy wrażliwe były na wankomycynę (MIC = 0,5–4,0 mg/l), linezolid (MIC = 0,5–2,0 mg/l) i daptomycynę (MIC ≤ 1 mg/l) z wyjątkiem dwóch izolatów *C. aquaticum*, których MIC dla daptomycyny wynosił 8 mg/l. Daptomycyna była zastosowana z powodzeniem w leczeniu skojarzonym z rifampicyną w przypadku *endocarditis* wywołanym przez *C. amycolatum* [11] i *C. striatum* [47]. Wysoka aktywność linezolidu wykazana w badaniach nad 190 szczepami coryneform przez Gomez-Garcés i wsp. [22] wskazuje na bardzo wysoką skuteczność tego antybiotyku, który może być zastosowany w leczeniu zakażeń wywołanych przez coryneform.

Zróznicowanie oporności na antybiotyki u gatunków z rodzaju *Corynebacterium* ma duży związek z miejscem występowania badanych szczepów. Jak stwierdzili Garcia-Bravo i wsp. [21] szczepy *C. urealyticum* pochodzące od pacjentów hospitalizowanych wykazują zdecydowanie wyższą oporność (wyższe wartości MIC) na antybiotyki, niż od pacjentów ambulatoryjnych. Przeprowadzono analizę częstości i czasu stosowanej antybiotykoterapii u chorych, co potwierdziło, że środowisko szpitalne i częściej stosowana antybiotykoterapia u pacjentów hospitalizowanych sprzyja występowaniu szczepów wielolekoopornych, a środowisko szpitalne, w jakim przebywają pacjenci jest miejscem występowania szczepów *C. urealyticum* wywołujących u nich zakażenia. Natomiast zdecydowanie niższa oporność na antybiotyki (niższe wartości MIC) izolatów pochodzących od pacjentów ambulatoryjnych wskazuje, że szczepy *C. urealyticum* pochodzą z mikroflory kolonizującej skórę chorego.

Niepokojącym faktem jest opisanie w 2005 roku wielolekoopornego nowego gatunku *C. resistens*. Jest on lipofilny, o słabych właściwościach fermentacyjnych (fermentuje glukozę), nie redukuje azotanów, nie wytwarza ureazy i pyrazinamidazy. Charakteryzuje się opornością na penicylinę i cefalosporyny (MIC > 64 µg/ml), imipenem (MIC > 32 µg/ml), aminoglikozydy (MIC > 3 µg/ml), makrolidy (MIC > 16 µg/ml), chinoliny (MIC > 32 µg/ml) oraz wrażliwością na teikoplaninę (MIC ≤ 0,5 µg/ml) i wankomycynę (MIC = 2 µg/ml) [34].

## 5. Podsumowanie

Coraz częstsze izolowanie z materiałów klinicznych wielolekoopornych szczepów z rodzaju *Corynebacterium* zwraca uwagę na pojawiający się problem związany z leczeniem zakażeń wywołanych przez tą

grupę bakterii oportunistycznych, tym bardziej, że zakażenia dotyczą często diagnostycznie trudnych przypadków, chorych hospitalizowanych, często z towarzyszącą chorobą powodującą obniżenie odporności. Niedoceniany udział coryneform w zakażeniach może prowadzić do błędów terapeutycznych.

Dokładna diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń wywołanych przez gatunki z rodzaju *Corynebacterium*, identyfikacja izolowanych szczepów do gatunku oraz określenie wrażliwości na antybiotyki metodami umożliwiającymi oznaczenie wartości MIC daje możliwość oceny występujących i pojawiających się mechanizmów lekooporności oraz umożliwia podejmowanie decyzji co do właściwej antybiotykoterapii. Zastosowanie metod biologii molekularnej i badanie genów oporności, ich lokalizacji oraz dróg przenoszenia, jest bardzo ważnym kierunkiem badań nad monitorowaniem mechanizmów oporności u coryneform i daje możliwość śledzenia i określenia ich udziału w transmisji genów między innymi gatunkami.

Badania nad wrażliwością na antybiotyki różnych gatunków wielolekoopornych z rodzaju *Corynebacterium* wskazują, że najwyższą skuteczność w leczeniu zakażeń wykazują: glikopeptydy, linezolid, daptomycyna, tigeicyklina, chinupristyna/dalfopristina.

## Piśmiennictwo

- Adderson E.E., Boudreaux J.W., Hayden R.T.: Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients, *Pediatr. Infect.* **2**, 136–141 (2008)
- Amao H., Moriguchi N., Komukai Y., Kawasami H., Takahashi S., Sawada T.: Detection of *Corynebacterium kutscheri* in the feces of subclinically infected mice. *Lab. Anim.* **3**, 376–382 (2008)
- Arthur M., Nolin C., Mabilat C., Courvalin P.: Detection of erythromycin resistance by the Polymerase Chain Reaction using primers in conserved region of *erm* rRNA methylase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**, 2024–2026 (1990)
- Baird G.J., Fontanie M.C.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* **4**, 179–210 (2007)
- Balci I., Esik F., Bayram A.: Coryneform bacteria isolated from blond cultures and their antibiotic susceptibilities, *J. Intern. Med. Res.* **30**, 422–427 (2002)
- Barnass S., Holland K., Tabaqchali S.: Vancomycin-resistant *Corynebacterium species* causing prosthetic valve endocarditis successfully treated with imipenem and ciprofloxacin. *J. Infect.* **2**, 161–169 (1991)
- Campanile F., Carretto E., Barbarini D., Grigis A., Falcone M., Goglio A., Venditti M., Stefani S.: Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 75–78 (2009)
- Chiner E., Arriero J.M., Signes-Costa J., Marco J., Corral J., Gomez-Esparrago A., Ortiz de la Tabla V., Martin C.: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in an immunocompetent patient. *Monaldi. Arch. Chest. Dis.* **54**, 325–327 (1999)
- Collins M.D., Hoyles L., Lawson P.A., Falsen E., Robson R.L., Foster G.: Phenotypic and phylogenetic characterization of a new *Corynebacterium* species from dogs: description of *Corynebacterium auriscanis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 3443–3447 (1999)
- Coyle M.B., Minshew B.H., Bland J.A., Hsu P.C.: Erythromycin and clindamycin resistance in *Corynebacterium diphtheriae* from skin lesion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 525–527 (1979)
- Dalal A., Urban C., Segal-Maurer S.: Endocarditis due *Corynebacterium amycolatum*. *J. Med. Microbiol.* **10**, 1299–1302 (2008)
- Deb J.K., Nath N.: Plasmids of corynebacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**, 11–20 (1999)
- Dorella F.A., Pacheco L.G., Oliveira S.C., Miyoshi A., Azevedo V.: *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, *Vet. Res.* **2**, 201–218 (2006)
- Dupon C., Turner L., Rouveix E., Nicolas M.H., Dorra M.: Endocardite à *Corynebacterium diphtheriae* tolerant à l'amoxicillin. *Presse Med.* **24**, 1135 (1995)
- Eguchi H., Kuwahara T., Miyamoto T., Nakayama-Imahiji H., Ichimura M., Hayashi T., Shiota H.: High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* **2**, 527–532 (2008)
- Freeman J.D., Smith H.J., Haines H.G., Hellyar A.G.: Seven patients with respiratory infection due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Pathology*, **26**, 311–314 (1994)
- Fernandez-Roblas R., Adames H., Martin-de-Hijas N.Z., Garcia Almeida D., Gadea I., Esteban J.: In vitro activity of tigeicycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, doi:10.1016/j.ijantimicag. 2008.11.001 (2009)
- Funke G., Efstratiou A., Kiklinska D., Hutson R., De Zoysa A., Engler K.H., Collins M.D.: *Corynebacterium imitans* sp. nov. isolated from patients with suspected diphtheria. *J. Clin. Microbiol.* **8**, 1978–1983 (1997)
- Funke G., Punter V., von Graevenitz A.: Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2874–2878 (1996)
- Funke G., von Graevenitz A., Clarridge III J.E., Bernard K.A.: Clinical Microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 125–159 (1997)
- Garcia-Bravo M., Aguado J.M., Morale J.M., Norwega A.R.: Influence of external factors in resistance of *Corynebacterium urealyticum* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 497–499 (1996)
- Gomez-Garces J-L., Alos J-I., Tamayo J.: In vitro activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria, *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29**, 688–692 (2007)
- Gross D.C., Vidaver A.K., Keralis M.B.: Indigenous plasmids from phytopathogenic *Corynebacterium* sp. *J. Gen. Microbiol.* **115**, 479–489 (1979)
- Hall R.M., Collis C.M., Kim M.J., Partridge S.R., Recchia G.D. Stokes H.W.: Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **870**, 68–80 (1999)
- Hodgson A.L., Krywult J., Radford A.J.: Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene from the *Corynebacterium* plasmid pNG2. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1891 (1990)
- Johnson A.P., Mushtaq S., Warner M., Livermore D.M.: Activity of daptomycin against multi-resistant Gram-positive

- bacteria including enterococci and *Staphylococcus aureus* resistant to linezolid. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **24**, 315–319 (2004)
27. Katsumata R., Ozaki A., Oka T., Furuya A.: Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **159**, 306–311 (1984)
  28. Kono M., Sasatsu M., Aoki T.: R plasmids in *Corynebacterium xerosis* strains. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **23**, 506–508 (1983)
  29. Lagrou J., Verhaegen M., Janssens G., Wauters G., Verbist L.: Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 7–15 (1998)
  30. Luna V.A., Coates P., Eady A., Cove J.H., Nguyen T.T.H., Roberts M.C.: A variety of Gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 19–25 (1999)
  31. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2006
  32. Martinez-Martinez L., Suarez A.I., Winstanley J., Ortega M.C., Bernard K.: Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical sample. *J. Clin. Microbiol.* **9**, 2458–2461 (1995)
  33. Ojo K.K., Striplin M.J., M., Ulep C.C., Close N.S., Zittle J., Luis H., Bernardo M., Leitao J., Roberts M.C.: *Staphylococcus* efflux *msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **3**, 1089–1091 (2006)
  34. Ostuka Y., Kawamura Y., Koyama T., Iihara H., Ohkusu K., Azeki T.: *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multi-resistant coryneform bacterium isolated from human infection. *J. Clin. Microbiol.* **8**, 3713–3717 (2005)
  35. Otsuka Y., Ohkusu K., Kawamura Y., Baba S., Azeki T., Kiura S.: Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **54**, 109–114 (2006)
  36. Perrin-Guyomard A., Soumet C., Leclercq R., Doucet-Populaire R., Sanders P.: Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from pasteurized milk and characterization of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance genes. *J. Food. Prot.* **2**, 347–352 (2005)
  37. Pitcher D., Johnson A., Allerberger F., Woodford N., George R.: An investigation of nosocomial infection with *Corynebacterium jeikeium* in surgical patients using a ribosomal RNA gene probe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**, 643–648 (1990)
  38. Power E.G., Abdullah Y.H., Talsania H.G., Spice W., Aathithan S., French G.L.: *vanA* genes in vancomycin-resistant clinical isolates of *Oerskovia turbata* and *Arcanobacterium (Corynebacterium) haemolyticum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **4**, 595–606 (1995)
  39. Riegel P., Ruimy R., Renard F.N.R., Freney J., Prevost G., Jehl F., Christen R., Monteil H.: *Corynebacterium singulare* sp. nov., new species for urease-positive strains related to *Corynebacterium minutissimum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **4**, 1092–1096 (1997)
  40. Roberts M.C., Leonard R.B., Briselden A., Schoenknecht F.D., Coyle M.B.: Characterization of antibiotic-resistant *Corynebacterium striatum* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**, 463–474 (1992)
  41. Roberts M.C., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L.B., Rood J., Seppala H.: Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2823–2830 (1999)
  42. Rosato A.E., Lee B.S., Nash K.A.: Inducible macrolide resistance in *Corunebacterium jeikeium*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **7**, 1982–1989 (2001)
  43. Ross J.I., Eady A.A., Carnegie E., Cove J.H.: Detection of transposon Tn5432 – mediated macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance in cutaneous propionibacterie from six European cities. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 165–168 (2002)
  44. Serwold-Davis T.M., Groman N.B.: Mapping and cloning of *Corynebacterium diphtheriae* plasmid pNG2 and characterization of ist relatedness to plasmids from skin coryneforms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 69–72 (1986)
  45. Serwold-Davis T.M., Groman N.B., Kao C.C.: Localization of an origin of replication in *Corynebacterium diphtheriae* broad host range plasmid pNG2 that also functions in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **54**, 119–123 (1990)
  46. Serwold-Davis T.M., Groman N., Rabin M.: Transformation of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* with the *C. diphtheriae* plasmid pNG2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4964–4968 (1987)
  47. Shah M., Murillo J.L.: Successful treatment of *Corynebacterium striatum* endocarditis with daptomycin plus rifampin. *Ann. Pharmacother.* **10**, 1741–1744 (2005)
  48. Sierra J.M., Martinez-Martinez L., Vazquez F., Giralt E., Vila J.: Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **5**, 1714–1719 (2005)
  49. Takahashi T., Tsuji M., Kikuchi N., Ishihara C., Osanai T., Kasai N., Yanagawa R., Hiramune T.: Assignment of the bacterial agent of urinary calculus in young rats by the comparative sequence analysis of the 16s rRNA genes corynebacteria. *J. Vet. Sci.* **3**, 515–517 (1995)
  50. Takeda Y., Fujii M., Nakajoh Y., Nishimura T., Isshiki S.: Isolation of tetracycline resistance plasmid from a glutamate-producing *Corynebacterium*, *Corynebacterium melassecola*. *J. Ferment. Bioeng.* **70**, 177–179 (1990)
  51. Tauch A., Kassing F., Kalinowski J., Pühler A.: The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene *ermcx*. *Plasmid*, **34**, 119–131 (1995)
  52. Tauch A., Kassing F., Kalinowski J., Pühler A.: The erythromycin resistance gene of the *Corynebacterium xerosis* R-plasmid pTP10 also carrying chloramphenicol, kanamycin and tetracycline resistance is capable of transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, **33**, 168–179 (1995)
  53. Tauch A., Krieff S., Kalinowski J., Pühler A.: The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 1–11 (2000)
  54. Tauch A., Krieff S., Pühler A., Kalinowski J.: The *tetAB* of the *Corynebacterium striatum* R-lasmid pTP10 encode an ABC transporter and confer tetracycline, oxytetracycline and oxacillin resistance in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**, 203–209 (1999)
  55. Tauch A., Zheng Z., Pühler A., Kalinowski J.: *Corynebacterium striatum* chloramphenicol resistance transposon

- Tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, **40**, 126–139 (1998)
56. Troxler R., Funke G., von Graevenitz A., Stock I.: Natural antibiotic susceptibility of recently established coryneform bacteria, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 315–323 (2001)
57. Tu K.K., Jorgensen J.H., Stratton C.W.: A Rapid paper-disc test for penicillinase. *Am. J. Clin. Pathol.* **75**, 557–559 (1981)
58. Weiss K., Laverdiere M., Rivest R.: Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disc diffusion methods, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **4**, 930–933 (1996)
59. Wendisch V.F., Bott M., Kalinowski J., Oldiges M., Wiechert W.: Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology, *J. Biotechnol.* **1**, 74–92 (2006)
60. Williams D.Y., Selepak S.T., Gill V.J.: Identification of clinical isolates of nondiphtherial *Corynebacterium* species and their antibiotic susceptibility patterns. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 23–28 (1993)
61. Wilson A.P.R.: Treatment of infections caused by toxigenic and non-toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**, 717–720 (1995)
62. www.abbiotest.com/Etest Application Sheet/Fastidious Gram Positive Bacilli EAS 021
63. Valbuena N., Letek M., Ordonez E., Atala J., Daniel R.A., Gil J.A., Mateos L.M.: Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*: peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. *Mol. Microbiology*, **66**, 643–657 (2007)
64. Vertes A.A., Inui M., Yukawa H.: Manipulating *Corynebacteria*, from individual genes to chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **12**, 7633–7642 (2005)
65. Von Hunolstein C., Scopetti F., Efstratiou A., Engler K.: Penicillin tolerance amongst non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from cases of pharyngitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 125–128 (2002)
66. Yague Guirao G., Mora Peris B., Martinez-Toldos M.C., Rodriguez Gonzalez T., Valero Guillen P.L., Segovia Hernandez M.: Implication of *ermX* genes in macrolide- and telithromycin-resistance in *Corynebacterium jeikeium* and *Corynebacterium amycolatum*. *Rev. Esp. Quimioterap.* **3**, 136–242 (2005)
67. Yassin A.F., Siering C.: *Corynebacterium sputi* sp. nov., isolated from the sputum of the a patient with pneumonia, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **12**, 2876–2879 (2008)
68. Zhen Z.H., Ma C.P., Yan W.Y., He P.F., Mao Y.X., Sun W., Lei Z.Z., Zhu P., Wu J.F.: Restriction map of plasmid pXZ10145 of *Corynebacterium glutamicum* and construction of an integrated plasmid. *Chin. J. Biotechnol.* **3**, 183–188 (1987)





## Od Redakcji

W 2010 roku upływa 100 lat od śmierci jednego z najwybitniejszych mikrobiologów przełomu XIX-tego i XX-ty wieku Roberta Kocha. Jak pisał o nim w *Postęпах Mikrobiologii* (PM. 32. 104–112. 1993) prof. Zbigniew Kwiatkowski, [Kocha] ... Nawet wtedy gdy był już u szczytu sławy nazywano... często po prostu „doktorem” lub nawet „doktorem z Wolsztyna”. Był lekarzem i jego zainteresowania miały zawsze podłoże praktyczne. Jego wielkość polegała na tym, że stworzył postawy nowoczesnej bakteriologii – szczególnie znaczenie mają dziś jego prace nad prątkiem gruźlicy, wąglikiem oraz cholera. Słynne „postulaty Kocha” pozwoliły na skuteczną identyfikację czynników sprawczych wielu chorób zakaźnych ludzi i zwierząt – stały się też podstawą metodyczną w przypadku badań eksperymentalnych nad chorobami zakaźnymi.

Obchody 100-lecia śmierci Roberta Kocha w Polsce inaugurowała w marcu br. Uroczysta Sesja Naukowa poświęcona Uczonemu oraz Światowemu Dniu Walki z Gruźlicą. Spotkanie odbyło się w sali Senatu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Relację z obrad autorstwa prof. Zofii Zwolskiej publikujemy niżej.

Jednocześnie informuję, iż w listopadzie 2009 r. Prezydium Z.G Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów podjęło uchwałę o organizacji przez PTM Konferencji Naukowej pt. Mikrobiologia

100 lat po Robercie Kochu. Spotkanie planowane jest na koniec sierpnia 2010 roku.

Jerzy Hrebenda

PS. W 2006 roku Gdańskie Wydawnictwo Via Medica wydrukowało prace prof. Zofii Zwolskiej pt. *Robert Koch twórca bakteriologii chorób zakaźnych*, książka poświęcona jest pamięci uczonego w 100-tą rocznicę otrzymania przez Niego nagrody Nobla za odkrycie prątków gruźlicy. Na 75 stronach omawianego dzieła znaleźć można obszerną biografię uczonego, relację z badań nad wąglikiem, gruźlicą, cholera, informacje na temat opracowanych przez Kocha technik badawczych, charakterystykę współczesnych mu uczonych i współpracowników. Osobne wątki poświęcone są metodologii badań nad etiologią chorób zakaźnych znanych obecnie pod hasłem „Postulatów Kocha”. Książkę kończą ciekawe informacje nt. Muzeum Roberta Kocha w Wolsztynie. Tekst wydanej na kredowym papierze pracy, jest bardzo bogato ilustrowany kolorowymi zdjęciami. Uderza szczególnie staranna redakcja tekstu oraz estetyczna forma graficzna książki.

Pozostając pod wrażeniem tego niezwykle udanego dzieła, chciałbym sugerować Władzom Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów wznowienie wydania książki z okazji planowanej Konferencji poświęconej Robertowi Kochowi.

Byłby to bardziej trwałe, niż ulotne referaty hołd oddany Uczonemu z okazji rocznicy jego śmierci.

## UROCZYSTA SESJA NAUKOWA Z OKAZJI 100-LECIA ŚMIERCI ROBERTA KOCHA ORAZ ŚWIATOWEGO DNIA WALKI Z GRUŻLICĄ

Prof. dr hab. Zofia Zwolska, Kierownik Zakładu Mikrobiologii, Krajowego Referencyjnego Laboratorium Prątka, email: z.zwolska@igichp.edu.pl



Ex Libris autorstwa dr Zbigniewa Józwicka ofiarowany Muzeum Roberta Kocha przez Warszawsko-Otowski Oddział PTCHP

rzęta należą do największych w świecie i są porównywalne tylko z zasługami Ludwika Pasteura. Koch wprowadził do medycyny coś nowego, ucząc równocześnie profilaktyki i leczenia oparte na etiologii. Opracował nowe techniki diagnozowania

Od wielu lat w dniu 24 marca cały świat obchodzi Światowy Dzień Walki z Gruźlicą równocześnie oddając hołd doktorowi Robertowi Kochowi – twórcy bakteriologii chorób zakaźnych, człowiekowi, którego imię od XIX w znane jest całemu cywilizowanemu światu. Dzień ten został ustanowiony dla upamiętnienia pierwszego raportu o odkryciu *Mycobacterium tuberculosis* czynnika przyczynowego gruźlicy, ogłoszonego przez Roberta Kocha w Berlińskim Towarzystwie Fizjologicznym.

Zasługi Roberta Kocha dla rozwoju bakteriologii chorób zakaźnych, dla zrozumienia ich roli w patogenezie ludzi i zwierząt

chorób infekcyjnych, rozwinął nowe pola działania na rzecz zdrowia publicznego i higieny, stworzył podwaliny epidemiologii chorób zakaźnych.

Koch przystąpił do badań nad gruźlicą z pobudek humanitarnych, uważając chorobę za najgroźniejszą klęskę społeczną, wobec której medycyna była bezradna. W XIX wieku gruźlica jako choroba masowo zabijająca i jako największa klęska społeczna stała się tematem zainteresowań wszystkich mieszkańców Europy Środkowej. Dokumenty opisujące epidemię gruźlicy w XIX wieku są liczne i różnorodne. Są nimi opisy i naukowe prace lekarskie, pamiętniki chorych, życiorysy zmarłych, artykuły dziennikarskie i inne.

W tym czasie endemia gruźlicy przerodziła się w epidemię. Tytuł znakomitych ludzi, poetów, muzyków, pisarzy, aktorów i innych umarło na gruźlicę płuc w XIX wieku, że ich życiorysy można porównać do pedantycznie prowadzonych historii chorób.

Prace R. Kocha nad gruźlicą skupiały się na metodyce pozwalającej barwić prątki gruźlicy w roztworach skrawków tkanek, metodach hodowli prątków *in vitro* na pożywkach najpierw płynnych, potem stałych i poszukiwaniu leków do leczenia gruźlicy. Ponadto R. Koch opracował na małych zwierzętach laboratoryjnych eksperymentalny model gruźlicy. Pozwoliło mu to na sformułowanie czterech warunków, które powinny być spełnione przy diagnozowaniu chorób zakaźnych. Są one znane po dziś dzień jako „postulaty Kocha” i stanowią kanon w wykrywaniu chorób

zakaźnych. 10 grudnia 1905 r. otrzymał Nagrodę Nobla za prace badawcze nad gruźlicą. W wykładzie noblowskim R. Koch wyraził przekonanie, że świat wkrótce upora się z problemem gruźlicy. Niestety, Koch nie przewidział, że 100 lat później problem gruźlicy nie tylko że nie zniknął, ale wprost przeciwnie stał się poważnym zagrożeniem zdrowia ludności na wszystkich kontynentach.

Na początku swojej kariery zawodowej i naukowej, przez 8 lat Robert Koch pracował na ziemi poznańskiej, początkowo w Rakoniewicach, później w Wolsztynie gdzie był lekarzem polskiej ludności. Pozwoliło mu to poznać język polski i swobodnie rozmawiać z pacjentami.

W Wolsztynie, w domu, w którym mieszkał i pracował Robert Koch, powstało muzeum. W muzeum eksponowane są pamiątki związane z pracą i pobytem Roberta Kocha w Wolsztynie, głównie fotografie i fotokopie dokumentów. Obok bogatej ekspozycji muzealnej, obrazującej jego życie i działalność, na szczególną uwagę zasługuje wyposażenie laboratorium, z zachowanym mikroskopem, instrumentami uczonego i faksymilia dokumentów osobistych Kocha. Na domu widnieją tablice po polsku i niemiecku z inskrypcją: „W tym domu mieszkał od 1872 do 1880 roku jako lekarz okręgowy późniejszy Tajny Radca Ekscelencja Profesor Robert Koch. Tutaj rozpoczął swoje wspaniałe odkrycie z dziedziny chorób infekcyjnych, które dały podstawy utworzenia wiedzy bakteriologicznej, a jego uczyniły jednym z największych dobroczyńców ludzkości”.

W oficynie budynku mieści się: Stowarzyszenie Naukowe im. Roberta Kocha i Fundacja im. Roberta Kocha, powołane 3 maja 1995 roku. Stowarzyszenie od momentu założenia organizuje sympozja naukowe i konferencje, upowszechnia wiedzę o życiu i działalności wielkiego uczonego, współpracując z Instytutem Roberta Kocha w Berlinie oraz potomkami wielkiego uczonego.

Warszawsko-Otwocki Oddział Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc od lat organizuje sesje naukowe pod patronatem Departamentu Stop TB Światowej Organizacji Zdrowia. Tegoroczna sesja poświęcona w całości gruźlicy pozapłucnej zadedykowana była pamięci Roberta Kocha, którego setna rocznica śmierci przypada 27 maja 2010 r. Konferencja odbyła się w Sali Senatu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach obchodów 200 lat nauczania medycyny w Warszawie. Honorowy patronat nad sesją objął Jego Magnificencja Rektor Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego prof. dr hab. med. Marek Krawczyk. Z okazji stulecia śmierci R. Kocha Warszawsko-Otwocki Oddział PTCHP przygotował okolicznościowy *exlibris* stanowi dar naszego oddziału dla Muzeum Roberta Kocha w Wolsztynie. Na uroczystą sesję przybył kustosz Muzeum, mgr Romuald Nowak, który odbierając pamiątkowy *exlibris* zrewanżował się Towarzystwu grafiką przedstawiającą dom Roberta Kocha w Wolsztynie. Na spotkaniu obecny był również autor *exlibrisu* dr Zbigniew Józwik, który ofiarował Warszawskiemu Uniwersytetowi Medycznemu inne *exlibrisy* o tematyce medycznej. Uroczystego otwarcia sesji dokonał Prorektor WUM prof. Sławomir Nazarewski. W swoim wystąpieniu podkreślił jak ważne jest dla warszawskiej uczelni kultywowanie tradycji akademickich, pamięć o wielkich poprzednikach, a równocześnie spojrzenie w przyszłość i prezentowanie nowoczesnej wiedzy medycznej.

Kolejno autorka niniejszego sprawozdania (prof. Zofia Zwolska) omówiła fakty biograficzne dotyczące życia osobistego i pracy zawodowej Roberta Kocha. W następnych wystąpieniach specjaliści omawiali epidemiologię, wykrywanie i leczenie różnych postaci gruźlicy pozapłucnej. Dr med. Małgorzata Grzemska, specjalista Departamentu Stop TB WHO w Genewie, przedstawiła aktualną sytuację epidemiologiczną gruźlicy i wyzwania jakie stają przed WHO w najbliższej przyszłości.

Dr med. Tadeusz Zielonka z Katedry i Zakładu Medycyny Rodzinnej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego omówił epidemiologię gruźlicy pozapłucnej na świecie i w Polsce. Pro-

blem ten nie jest szczegółowo monitorowany przez WHO, ponieważ uważa się, że pozapłucne lokalizacje gruźlicy są mniej zakaźne niż gruźlica płuc. Ocenia się, że każdego roku u ponad 1,12 mln osób dochodzi do rozwoju pozapłucnej gruźlicy. Odsetek pozapłucnej gruźlicy jest bardzo zróżnicowany geograficznie od 6,5% w regionie Zachodniego Pacyfiku do 20% na Bliskim Wschodzie. W niektórych krajach europejskich, takich jak np. Finlandia, Szwecja lub Holandia, gruźlica pozapłucna stanowi ponad 30% wszystkich zachorowań, natomiast w Polsce jest to zaledwie 7%. Najczęstsze lokalizacje pozapłucnej gruźlicy to opłucna, układ moczowo-płciowy, kostno-stawowy i węzły chłonne. **Doc. dr hab. n.med. Ewa Augustynowicz-Kopeć** z Krajowego Referencyjnego Laboratorium Prątko omówiła zasady diagnostyki gruźlicy pozapłucnej, która jest znacznie trudniejsza niż w przypadku płucnych lokalizacji. Potwierdzenie gruźliczego tła zmian pozapłucnych wymaga często wykonania badań inwazyjnych, ale czułość metod bakteriologicznych w tych przypadkach jest niższa niż w gruźlicy płuc. Nowoczesne metody diagnostyczne, w tym szczególnie genetyczne pozwalają jednak na potwierdzenie wielu przypadków o innej lokalizacji niż płuca. Pierwszą sesję zakończył wykład **doc dr hab. n. med. Andrzeja Horbana**, dyrektora Szpitala Zakaźnego, który przedstawił gruźlicę krwiopochodną u chorych na AIDS. Pozapłucne postacie gruźlicy występuje znacznie częściej w przypadkach chorych na AIDS. W Polsce liczba zakażeń HIV jest znacznie mniejsza niż w innych regionach świata. Rocznie stwierdza się około 70 przypadków gruźlicy u chorych na AIDS. Leczenie tych chorych jest jednak znacznie trudniejsze i często mniej skuteczne.

W drugiej sesji omówione zostały najważniejsze lokalizacje gruźlicy pozapłucnej. Jako pierwszy wystąpił **prof. dr hab. n.med. Andrzej Borkowski**, kierownik Kliniki Urologii WUM, który omówił zmiany gruźlicze w układzie moczowym. W przeszłości i obecnie jest to częsta lokalizacja gruźlicy. Badanie bakteriologiczne w znacznym odsetku potwierdza tę postać gruźlicy. Kolejne, ważne wystąpienie **dr med. Mirosławy Nowak-Misiak** z jedynej w Polsce oddziału ortopedycznego specjalizującego się leczeniu gruźlicy narządów ruchu dotyczyło poważnych problemów diagnostycznych i terapeutycznych w leczeniu gruźlicy kości i stawów wymagających poza lekami długiego unieruchomienie zmienionych chorobowo kości i stawów.

Problemy związane z gruźlicą dziecięcą omówił **doc. dr hab. n. med. Jerzy Ziolkowski** z Kliniki Pediatrii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. U dzieci najczęstszą postacią choroby jest gruźlica węzłów chłonnych obwodowych i śródpiersia. **Dr med. Aleksandra Dańczak-Pazdrowska** z Kliniki Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu podzieliła się swoim doświadczeniem w rozpoznawaniu i leczeniu skórnych postaci gruźlicy. Szczególnie groźną postacią gruźlicy są neuroinfekcja. Do jej rozpoznania na ogół konieczne jest nakłucie łądźwiowe i szybka diagnostyka bakteriologiczna i genetyczna. Wymaga to dużego doświadczenia, takiego jakie posiadał kolejny wykładowca **dr n. med. Dariusz Lipowski** ze Szpitala Zakaźnego przy ul. Wolskiej, który od lat zajmuje się tymi przypadkami. Gruźlica górnych dróg oddechowych, którą przedstawił **prof. dr hab. n. med. Kazimierz Niemczyk** może szerzyć się z płuc przez ciągłość co sprzyja zakażeniom tej lokalizacji. Ta postać choroby jest bardzo zakaźna dla otoczenia i powinna być bardzo szybko zdiagnozowana i leczona. Ostatnia prezentacja **prof. dr hab. n. med. Janina Orłowska** z Kliniki Gastroenterologii CMKP dotyczyła diagnostyki różnicowej gruźlicy przewodu pokarmowego. Rozpoznanie tej postaci jest bardzo trudne i często opiera się na badaniu histopatologicznym wycinków z miejsc zmienionych chorobowo.

Po wygłoszonych prezentacjach toczyła się długa, merytoryczna dyskusja. Konferencję zakończono wspólnym posiłkiem.

---

## Od Redakcji

Uprzejmie proszę PT. autorów o możliwie szybkie uregulowanie zaległych opłat – powstałych w 2009 roku – za publikowanie artykułów w *Postęпах Mikrobiologii*. Pismo nasze od roku pozbawione jest dotacji MNiSW, stąd brak wpływów z ww. tytułu, znacznie utrudnia kierownictwu PTM realizację statutowej działalności.

Z góry dziękujemy za pozytywny odzew na naszą prośbę.

Za Redakcję PM.  
*Jerzy Hrebenda*

---

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

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

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

Opłatę można wносить indywidualnie. W tym przypadku dowód wpłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. W imieniu Autorów opłatę może wносить sponsorująca instytucja, fundacja itp. Wtedy Autorzy zobowiązani są do złożenia w Redakcji wraz z manuskrytem pisemnego zobowiązania się do bezzwłocznej opłaty za publikację po otrzymaniu faktury VAT oraz niezbędne do wystawienia faktury VAT dane (NIP, nazwa i adres instytucji lub osoby fizycznej).

Do dowodu wpłaty lub zobowiązania zapłaty **dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko autora korespondencyjnego.**

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

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

---



## Spis treści

M. Kizerwetter-Świda, M. Binek – Zatrucie jadem kiełbasianym – problem wciąż aktualny .....	75
A. Słońska, D. Klimuszko – Bakteriocyny probiotycznych pałeczek z rodzaju <i>Lactobacillus</i> .....	87
K. Karabin, E. Chudzik, T. Dzieciatkowski – Zakażenia alfaherpeswirusami u osób z upośledzeniem odporności .....	97
K. I. Wolska, A. M. Grudniak, A. Kraczkiewicz-Dowjat, A. Kurek – Różnorodne funkcje wybranych pigmentów bakteryjnych .....	105
D. Plewik, M. Kozioł-Montewka – Udział Toll-like receptorów w zakażeniach grzybiczych .....	115
A. M. Olander – Mechanizmy oporności na antybiotyki wykrywane u bakterii z rodzaju <i>Corynebacterium</i> .....	119
INFORMAJE, KOMUNIKATY, RECENZJE .....	129

## Contents

M. Kizerwetter-Świda, M. Binek – <i>Clostridium botulinum</i> toxicosis – still a serious problem .....	75
A. Słońska, D. Klimuszko – Bacteriocins produced by probiotic rods of the genus <i>Lactobacillus</i> .....	87
K. Karabin, E. Chudzik, T. Dzieciatkowski – Alphaherpesviral infections in patients with immunological disorders .....	97
K. I. Wolska, A. M. Grudniak, A. Kraczkiewicz-Dowjat, A. Kurek – Various functions of selected bacterial pigments .....	105
D. Plewik, M. Kozioł-Montewka – Toll-like receptors participation in fungal infections .....	115
A. M. Olander – Mechanisms of resistance to antibiotics in the species of the genus <i>Corynebacterium</i> .....	119
INFORMATION, NEW REPORTS, BOOKS REVIEWS .....	129