

Kwartalnik

Tom 49

Zeszyt 3 • 2010

CODEN:

PMKMAV 49 (3)

2010

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Zeszyt specjalny
poświęcony Robertowi Kochowi

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
Impact Factor = 0,108

<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 Krasilnikowa 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 Krasilnikowa 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 1750 + 15 egz., Objętość 12 arkuszy wyd., Papier offser 90 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

KONFERENCJA NAUKOWA
POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

„Mikrobiologia 100 lat po Robercie Kochu”

WARSZAWA, 30 – 31. 08. 2010 r.

Pod honorowym patronatem
Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego
Prof. dr hab. Barbary Kudryckiej
oraz
Ambasadora Republiki Federalnej Niemiec
Pana Rüdiger von Fritsch-Seerhausen

KOMITET ORGANIZACYJNY KONFERENCJI:

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW, ZARZĄD GŁÓWNY
UL.CHEŁMSKA 30/34, 00-725 WARSZAWA
tel. 22 841 33 67
fax: 22 841 29 49
e-mail: sekret@cls.edu.pl

Opracowanie materiałów zjazdowych
pod względem merytorycznym i redakcyjnym:

Prof. dr hab. Stanisława Tylewska-Wierzbowska

NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO
PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY

00-791 Warszawa
ul. Chocimska 24
stylewska@pzh.gov.pl

Koleżanki i Koledzy, Szanowni Państwo,

Rok 2010 jest szczególnym rokiem dla mikrobiologów na całym świecie, także w Polsce. Upływa właśnie 100 lat od śmierci Roberta Kocha, jednego z najwybitniejszych uczonych, noblisty, pioniera współczesnej mikrobiologii i nauki o chorobach zakaźnych. Nie sposób wyliczyć jego zasług. Poza odkryciem prątka gruźlicy, przecinkowca cholery i laseczki wąglika pracował także nad innymi drobnoustrojami i metodami ich izolacji. Sformułował na podstawie badań nad wąglikiem kryteria, znane jako „postulaty Kocha”, jakie musi spełniać drobnoustrój aby uznać go za czynnik etiologiczny choroby. Część swego życia zawodowego spędził w Wolsztynie (ówczesny zabór pruski, obecnie w Wielkopolsce) pracując tam jako lekarz powiatowy i z tego powodu jest nam również bliski. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów pragnie uczcić pamięć Roberta Kocha na specjalnie poświęconej Jemu i Jego dorobkowi konferencji naukowej (Pałac Staszica, Warszawa, dn. 30–31 sierpnia), w której wielu znakomitych badaczy przedstawi rozwój mikrobiologii lekarskiej od czasów Kocha do współczesności. Oddajemy do Państwa rąk specjalny numer „Postępów Mikrobiologii”, w którym zawarta jest część tematyki konferencji.

Warszawa, sierpień 2010-08-10

Prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz
Prezes Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

Zofia Zwolska

Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc Warszawa, Płocka 26
e-mail: z.zwolska@igichp.edu.pl

1. Wstęp. 2. Robert Koch – fakty biograficzne. 3. Robert Koch – student i młody lekarz. 4. Praca zawodowa. 5. Robert Koch – życie rodzinne. 6. Koch w Wolsztynie. 7. Badania nad węglikiem. 8. Fotografowanie mikrobów. 9. Koch – bakteriolog. 10. Prace w laboratorium nad czystymi kulturami. 11. Badania nad gruźlicą. 12. 24 Marzec 1882. 13. Postulaty Kocha. 14. Prace nad cholera. 15. Tuberkulina. 16. Inne choroby zakaźne. 17. Nagroda Nobla. 18. Odznaczenia i honory. 19. Muzeum w Wolsztynie, Stowarzyszenie Naukowe im. Roberta Kocha, Fundacja im. Roberta Kocha

Robert Koch and their achievements – a history

Abstract: The year 2010 marks the 100th anniversary of Robert Koch's death. Heinrich Herman Robert Koch, born December 11, 1843 in Clausthal, died May 27, 1910 in Baden-Baden, was a German medical bacteriologist, physician, one of the founders of the science of bacteriology, who discovered the tubercle bacillus (1882) and cholera bacillus (1883). He won the Nobel Prize for Physiology and medicine in 1905. Koch developed new techniques and adapted old techniques to new uses. With his students, he created the majority of techniques for the modern study of bacteria. Koch established the new fields of medical bacteriology, public health and hygiene. Koch's great contribution to the development of bacteriology was his introduction of pure culture technique using solid and semi solid media. This technology led to the isolation and characterization of microorganisms causing many bacterial diseases which affected humans.

1. Introduction. 2. Robert Koch – biography. 3. R. Koch – student and young physician. 4. Medical work. 5. Robert Koch – family life. 6. Koch in Wollstein. 7. *Anthrax* research. 8. Photography of bacteria. 9. Koch – the great bacteriologist. 10. Pure cultures. 11. Research on tuberculosis. 12. 24th March 1882. 13. Koch's postulates. 14. *Vibrio cholerae* research. 15. Tuberculin. 16. Other infections diseases, 17. Nobel Prize. 18. Awards, honours. 19. Muzeum in Wollstein

Słowa kluczowe: Robert Koch, biografia, prace nad węglikiem, cholera, gruźlicą, inne choroby zakaźne, nagrody, odznaczenia, Nagroda Nobla, Muzeum im. R. Kocha w Wolsztynie

Key words: Robert Koch, biography, anthrax, cholera and tuberculosis research, other infections diseases, awards, honours, Muzeum in Wollstein

1. Wstęp

100 lat temu 27 V 1910 r. w Baden-Baden zmarł na atak serca Robert Koch. Miał 67 lat. Zgodnie z jego wolą prochy umieszczono w Instytucie Chorób Zakaźnych jego imienia w Berlinie. Wszystko, czego dokonał i opisał pozostaje aktualne do dzisiaj. Dokonując swoich odkryć na pewno nie przewidywał jak wiele istnień ludzkich ocali. Zasługi Roberta Kocha dla rozwoju bakteriologii chorób zakaźnych, zrozumienia ich roli w patogenezie ludzi i zwierząt należą do największych w świecie. Obok Ludwika Pasteura pozostaje On twórcą nowoczesnej bakteriologii chorób zakaźnych.

Do końca życia pozostał lekarzem a jego zainteresowania i prace badawcze miały zawsze podłoże praktyczne. Nawet wtedy, gdy był u szczytu sławy nazywano go często „doktorem” lub „doktorem z Wolsztyna”. Pierwsza samodzielna praca naukowa i praktyka lekarska Uczonego rozpoczęła się właśnie w Wolsztynie. I chociaż w tamtych czasach Wolsztyn, jak cała Wielkopolska, należał administracyjnie do Zaboru

Pruskiego i był pod ich administracją, ale chorzy, których leczył byli narodowości polskiej i warunki, w których pracował cechowała polskość. Praca naukowa, którą rozpoczął w Wolsztynie ukształtowała późniejsze losy badacza i zaprowadziła go na szczyty sławy naukowej uhonorowanej Nagrodą Nobla.

2. Robert Koch – fakty biograficzne

Robert Herman Koch urodził się 11 grudnia 1843 r. w Clausthal w górach Harzu jako trzecie dziecko spośród 13 dzieci Hermana i Matyldy Kochów. Jego ojciec był inżynierem-górnikiem z tytułem sztygara. Warto dodać, że Herman Koch znał osobiście szwedzkiego inżyniera górnictwa Alfreda Nobla obaj prowadzili pierwsze próby z nitrogliceryną w kamieniołomach w górach Harzu.

Robert Koch był bardzo zdolnym dzieckiem, w wieku 5 lat rozpoczął szkołę i bardzo szybko nauczył się czytać, grać w warcaby i szachy. Dzięki atmosferze rodzinnego domu rósł i dojrzewał w kulcie

Goethego i innych znakomitości XIX w. Uczęszczał do lokalnego gimnazjum i już wtedy wykazywał duże zainteresowanie naukami przyrodniczymi oraz, podobnie jak jego ojciec, zamiłowaniem do podróży. Robert Koch był utalentowany artystycznie. Grał nieźle na fortepianie i cytrze, potrafił śpiewać, dobrze rysował. W czasie pobytu u wuja w Hamburgu poznał ówczesną sztukę fotografii tzw. dagerotypię, którą sprawnie posługiwał się. Ta umiejętność okazała się bardzo przydatna w latach późniejszych przy dokumentowaniu prac badawczych. Był młodzieńcem poważnym, odznaczającym się błyskotliwą inteligencją. Fizycznie był średnio rozwinięty, raczej drobnej postury, od dzieciństwa był krótkowidzem. Był chłopcem zdrowym, zahartowanym i biologicznie odpornym. Biegłe posługiwał się oprócz języka ojczystego niemieckiego, językiem angielskim, francuskim, łaciną i greką, a w późniejszych latach również polskim i hebrajskim.

3. Robert Koch student i młody lekarz

W 1862 r. Robert Koch zdał z wyróżnieniem maturę i w tym samym roku rozpoczął studia na Uniwersytecie w Getyndze. Początkowo, przez 3 semestry studiował matematykę, fizykę i botanikę, potem przeniósł się na medycynę. Po wielu latach wspominał, że studia botaniczno-matematyczne dały mu podstawy racjonalnego i logicznego oceniania swoich badań mikrobiologicznych. Manuskrypt pierwszej samodzielnej pracy, którą dedykował ojcu nosił hasło: *Numquam otiosus* – Nigdy bezczynnym. Hasło to stanowiło motto życia i towarzyszyło Kochowi przez całe jego życie.

W siódmym semestrze studiów otrzymał nagrodę naukową (dyplom i 80 talarów), ufundowaną przez Wydział Lekarski Uniwersytetu w Getyndze za opracowanie „O występowaniu komórek zwojowych w macicy”, która została wydana drukiem w 1865 r. Następną pracą z okresu studiów dotyczyła powstawania kwasu bursztynowego w organizmie ludzkim.

W wieku 22 lat Koch był już autorem dwóch poważnych prac naukowych ogłoszonych drukiem. Na Uniwersytecie w Getyndze poznał wielu interesujących wykładowców, wśród nich profesora anatomii prawidłowej i patologicznej Jakuba Henle, który wywarł wielki wpływ na rozwój europejskiej histologii. Publikacja profesora Henle z 1840 r. w której rozwinął myśl, że przyczyną chorób zakaźnych są żywe, patogene organizmy, niewidoczne dla oka ludzkiego tylko ze względu na ich bardzo nikłą mikroskopijną postać, ale przy pomocy odpowiednich przyrządów optycznych będą widoczne. Ta teoria zrobiła na Kochu wielkie wrażenie.

Ta ciekawa teoria Henle'go osiadła głęboko w młodym umyśle Roberta Kocha i zafascynowała nim z nie-

bywałą siłą. W młodym studencie zaczęła się budzić natura przyszłego badacza i myśliciela.

Innym, wielce szanowanym przez Kocha nauczycielem był chemik Fryderyk Wohler, który w 1828 r. dokonał syntezy mocznika. To on swoimi odkryciami nad syntezą substancji organicznych zainspirował Kocha do pracy nad kwasem bursztynowym. Studia ukończył *cum laude* w Hanowerze 13 stycznia 1866 r., wygłaszając po łacinie wykład: „O powstawania kwasu bursztynowego w organizmie ludzkim” uprawniający go do wykonywania samodzielnej praktyki lekarskiej i akuszerskiej. Ze wspomnień o Kochu wiadomo, że w pracach nad kwasem bursztynowym uczestniczył sam jako „obiekt doświadczalny”.

W tym samym czasie Wydział Lekarski Uniwersytetu w Getyndze nadał mu za doświadczenia i publikacje dotyczącą komórek zwojowych w macicy tytuł doktora medycyny bez nowej dysertacji. W okresie pomiędzy promocją dokorską a egzaminem państwowym dla uzupełnienia wiedzy fachowej przebywał w słynnej klinice berlińskiej Charité, gdzie spotkał największy autorytet medycyny niemieckiej Rudolfa Virchowa. Koch chciał słuchać wykładów wielkiego profesora anatomii patologicznej. Znał jego podręcznik „Patologię komórkową” i poglądy Virchowa „że wszystkie choroby powinny być rozpatrywane jako wynik zjawisk destrukcyjnych w komórkach”. Koch był niezadowolony z pobytu w Charité, ponieważ w klinice przebywało wielu młodych stażystów. Tłok jaki panował w czasie omawiania trudnych przypadków uniemożliwiał z nim wszelki kontakt. Bez możliwości osobistego spotkania Virchowa, po czterech tygodniach wyjechał z Berlina. W latach późniejszych profesor Virchow stał się zaciekle antagonistą Kocha w dziedzinie zapatrywań na przyczyny chorób zakaźnych, a w szczególności gruźlicę, której etiologię przypisywał chorobie nowotworowej. Virchow zaprzeczał twierdzeniu, że bakterie w ogóle mogą być przyczyną chorób. Do końca swoje życie nie zaakceptował bakteryjnej etiologii gruźlicy.

4. Praca zawodowa

Po skończonych studiach medycznych Koch zwlekał z podjęciem decyzji: pozostać w Niemczech, wyjechać za granicę, np. jako lekarz w Pettersburgu (skąd *nota bene* jego podanie odrzucono) czy zaciągnąć się na statek w charakterze lekarza okrętowego. Rodzice obawiali się rozstania z synem i radzili mu podjęcie pracy blisko siebie, w Hamburgu.

Swoją pierwszą pracę zawodową rozpoczął w połowie 1866 r. jako lekarz w szpitalu ogólnym w Hamburgu, później w zakładzie wychowawczym i opiekuńczym dla dzieci duchowo zaniedbanych w Langenhangen pod

Hanowerem. Oprócz tego prowadził prywatną praktykę, która poza Langenhangen obejmowała 6 innych gmin. Bardzo szybko zdobył zaufanie pacjentów, co znacznie poprawiło jego warunki materialne. Koch mógł teraz pomyśleć o założeniu rodziny.

5. Robert Koch – życie rodzinne

Młodzięcza przyjaźń z koleżanką szkolną Gemmy Adolfiną Fraatz przerodziła się w miłość i w 1868 r., w dwa lata po ukończeniu studiów, zawarli związek małżeński. W tymże roku osiedlili się w Nemegek w pobliżu Poczdamu, gdzie przyszła na świat ich jedyna córka Gertruda. Truda uwielbiała ze wzajemnością ojca i pomagała mu w pracach badawczych. Wysłała później za mąż za lekarza wojskowego, późniejszego współpracownika Kocha, profesora Eduarda Pfuhl'a (1852–1917), z którym miała troje dzieci, a następnie dziesięcioro wnuków. Jeden z prawnuków Kocha inż. architekt Wolfgang Pfuhl, mieszkający w Nienburgu w Niemczech jest członkiem Rady fundacji R. Kocha. Utrzymuje stały kontakt z Polską i często odwiedza muzeum w Wolsztynie.

Krótki pobyt w Nemegek był dla niego i młodej Emmy jednym z najcięższych i najbardziej przykrych okresów w życiu. Brakowało im środków do życia. Niektóre źródła opisują sytuację finansową rodziny Kochów jako „materialną ruinę, graniczącą z głodem i nędzą”. W tej sytuacji zdecydował się po raz drugi na przestrzeni jednego roku, na ponowną zmianę miejsca w poszukiwaniu pracy. W rok później (1869 r.) przeniósł się do Rakoniewic, miejscowości odległej o 12 km od Wolsztyna w prowincji poznańskiej, gdzie zajmował się położnictwem i ogólną praktyką lekarską co poprawiło znacznie sytuację materialną rodziny. Praca ta bardzo go absorbowała, nie pozostawiając wiele czasu na badania naukowe.

Wiele lat później Koch przeżył romantyczną miłość. Zakochał się, w młodszej od siebie o 30 lat Hedwig Freiburg. Hedwig studiowała sztukę aktorską i występowała w teatrze Schillera w Berlinie. Była niezwykle uzdolniona artystycznie, grała główne role w spektaklach, śpiewała i malowała. Romans doprowadził do rozwodu z Emmą, a w 1893 r. Koch poślubił Hedwig. Wśród gości weselnych była obecna córka Kocha, Truda wraz z mężem prof. Edwardem Pfuhl'em. Nowa miłość i nowa żona wywołały ogromne poruszenie w świecie medycznym Europy. W czasie Kongresu w Lipsku w 1892 r., profesorowie bardziej interesowali się romansem Kocha niż jego niezwykłymi wykładami. Aktorka wiernie towarzyszyła mężowi w jego życiu wypełnionym badaniami medycznymi. Gdy podróżowali razem do Paryża aktorka i malarka była bardzo zainteresowana sztuką Luwru, razem zwiedzali miasto,

wieczory spędzali w teatrach, a potem w kafejkach i kabaretach na Montmartre. Koch okazał się doskonałym znawcą sztuki, był przewodnikiem po muzeach i mimo przekroczenia 60 r. życia czuł się młodo.

Wiele dalekich podróży do Indii, Afryki i innych w ostatnich 10 latach życia badacza odbyli wspólnie. Hedwig umarła w 1945 r.

6. Koch w Wolsztynie

Podczas wojny francusko-niemieckiej był wcielony jako ochotnik do wojska i na przełomie lat 1870/71 pracował jako lekarz w szpitalu wojskowym. Skierowany początkowo do 11 lazaretu polowego X Armii, później przeniesiono go do lazaretu dla chorych na dur brzuszny w Neuf-Chateau w Lotaryngii. Opieka nad chorymi żołnierzami i przebieg kliniczny choroby przywiodły mu na myśl hipotezę nauczyciela uniwersyteckiego z Getyngi, Jakuba Henle o *Contagium*. Po roku, na żądanie ludności Rakoniewic i okolicy wrócił na swoje poprzednie stanowisko lekarza-praktyka.

W marcu 1872 r. po złożeniu przed komisją w Berlinie obowiązkowych egzaminów na stanowisko lekarza powiatowego uzyskał nominację na lekarza powiatu „fizyka okręgowego” – dzisiaj tytuł i urząd odpowiadający dyrektorowi stacji sanitarno-epidemiologicznej – babimojskiego z siedzibą w mieście Wolsztynie. Stanowisko gwarantowało mu uzyskanie środków na prowadzenie badań naukowych.

Przychodnia lekarska mieściła się przy ulicy Weisensenn Berg 12 (Biała Góra 12) – obecnie ulica Roberta Kocha, na parterze, w największym pokoju, gdzie później umieścił także swoją pracownię i ciemnię fotograficzną. Dwupiętrowy dom, który zajmował Koch był ładnie usytuowany, zdobiony sztukateriami przy brukowanej, głównej ulicy. Wybudowany dawno temu w stylu neogotyku angielskiego, jego pierwotnym przeznaczeniem był szpital dla biednych. Stąd pochodzi nazwa „Szpital pod Samarytaninem”. Na pierwszym piętrze mieszkała rodzina Kochów. Gabinet swój przedzielił Koch kotarą, za którą urządził sobie laboratorium, z długim stołem, butelkami z odczynnikami, instrumentami, mikroskopem i dużą naftową lampą. Za domem w ogrodzie rósł wielki kasztanowiec, pod którym odpoczywał Koch wraz z ulubionym psem jamnikiem. Kasztanowiec ten rośnie po dzień dzień w tym samym parku.

Był rok 1869. Koch leczył mieszkańców Wolsztyna, głównie Polaków i Żydów. Pierwszym jego tłumaczem była polska służąca Julia. Wzywany był, głównie nocą do polskich chłopów z okolicznych wsi. W wolnych chwilach grał na cytrze, czytał czasopisma medyczne i botaniczne, oglądał świat istot mikroskopijnych, hodował w ogródku przy domu króliki,



Portret Roberta Kocha
(ze zbiorów Muzeum Roberta Kocha w Wolsztynie)

myszy polne (myszy białe nie były jeszcze stosowane jako zwierzęta doświadczalne), żaby, a nawet małpę, co budziło sensację w miasteczku. Koch był popularny i lubiany wśród polskiej ludności. Zarobki wystarczały mu nie tylko na zaspokojenie potrzeb rodziny, ale również na zorganizowanie małego laboratorium, które wyposażył w mikroskop Hartnack'a. Oprócz tego miał mały mikroton, oraz zbudowany z własnej inwencji inkubator. Pozwoliło mu to rozpocząć prace nad algami, które szybko zamienił na chorobotwórcze mikroorganizmy. Laboratorium było również wyposażone w urządzenie do mikrofotografii i posiadało ciemnię zrobioną z szafy ubraniowej. W takich warunkach powstały jedne z największych odkryć naukowych w świecie dotyczące etiologii chorób zakaźnych.

8. Badania nad wąglikiem

W roku 1850 francuski weterynarz Pierre Rayer (1793–1867) ogłosił odkrycie laseczki wąglika (*Bacillus anthracis*) we krwi zwierząt padłych z powodu *anthrax.*, które to bakterie udało mu się przenieść na zdrowe zwierzęta. Pięć lat później, w 1855 r. Franz Antoine Pollender (1800–1879) opublikował

to samo odkrycie, oparte na obserwacjach poczynionych w 1849 r., kiedy to z krwi padłych zwierząt wyizolował tę samą bakterię patogenną. Kolejno, francuski lekarz i parazytolog Casimir-Joseph Davaine (1812–1882) stwierdził te same bakterie we krwi ludzi chorych na podobną chorobę. Zainspirowany pracami Pasteura (1822–1895), Davaine w 1863 r. potwierdził, że krew zdrowych owiec była wolna od bakterii obecnych u zwierząt chorych. Ale na tym etapie obserwacji daleko było jeszcze do pełnej wiedzy o wągliku. Davaine nie posiadał laboratorium, a zwierzęta, na których prowadził obserwacje przechowywał w ogrodzie przyjaciół. Mimo trudnych warunków udało mu się wywołać objawy kliniczne wąglika w warunkach eksperymentalnych, przenosząc milionową objętość kropli chorego zwierzęcia na zdrowego. Następne etapy pracy były udziałem R. Kocha. W 1873 r. R. Koch rozpoczął pracę nad wąglikiem, a ukończył ją po 3 latach. Koch nie posiadał odpowiednio wyposażonego laboratorium, był daleko od bibliotek i kontaktów z innymi naukowcami – był zdany sam na siebie.

Badania rozpoczął szczegółowym przeglądem pod mikroskopem dużej kolekcji rozmazów krwi zwierząt z objawami klinicznymi wąglika. Do badań użył padliny owiec. Jako kontroli używał rozmazów krwi zwierząt zdrowych. Już pierwsze wyniki były zadawalające. W polu widzenia mikroskopu spostrzegł pomiędzy pojedynczymi erytrocytami obce twory w kształcie laseczek, analogiczne do domniemyanych zarazków wąglika, jakie opisywał wcześniej Pollender i inni współcześni badacze. Obserwowane w mikroskopie twory były jednak martwe, nie poruszały się i nie wykazywały tendencji do rozmnażania. Dla Kocha było jasne, że obserwowane „twory” u zwierząt chorych są przyczyną śmiertelnej choroby. Koch bardzo chciał aby drogą eksperymentalną wykazać, że obserwowane pod mikroskopem „martwe i nieruchome” – jak się wydawało drobnoustroje – są w rzeczywistości żywe i w pełni zdolne do przenoszenia infekcji.

Z powodu braku pieniędzy nie mógł takich eksperymentów przeprowadzać na dużych zwierzętach (owcach lub kozach), podjął więc jako pierwszy badacz próby na gryzoniach. Myszy okazały się w pełni przydatne do wielu rodzajów eksperymentów bakteriologicznych. Stopniowo wprowadził z powodzeniem inne drobne ssaki – króliki i świnki morskie. Eksperymentując na myszach użył do przeniesienia materiału z tkanki chorego zwierzęcia drewnianego patyczka zanurzonego we krwi. Drewniana bagietka została wprowadzona pod naciętą w okolicę ogona skórę myszy. Mysz padła po 24 h, a w czasie sekcji Koch stwierdził zmiany anatomopatologiczne odpowiadające wągliкови, zaś we krwi typowe laseczki. Potwierdziły się wyniki analogicznych badań przeprowa-

dzonych wcześniej przez Davaine'a, że laseczki węgliku w niedogodnych warunkach przechodzą w postać przetrwalnikową i w tym stanie mogą trwać całe lata, odzyskując żywotność w ustroju żywym. Ponadto, udowodniona została przydatność gryzoni do eksperymentów medycznych.

Zamysłem Kocha było prowadzenie badań *in vitro*, poza normalnymi warunkami makroustroju. Do tego typu hodowli mikroorganizmów potrzebne były odpowiednie warunki biochemiczne, głównie pożywki inkubacyjne.

W 1872 r. lekarz-mykolog, uczeń Cohn'a Joseph Schroeter (1837–1894) odkrył, że bakterie wytwarzające barwnik wyrastają w postaci kolonii na pożywkach stałych wzbogacanych ziemniakiem, zestaloną masą jajową, mięsem, lub chlebem i dają początek kolejnym koloniom. Te obserwacje dały impuls Kochowi do pracy, którą przedstawił 5 lat później. Chociaż koncepcja możliwości prowadzenia hodowli mikroorganizmów poza organizmem gospodarza była dziełem Pasteura, to wprowadzenie techniki czystych kultur bakteryjnych jest dziełem Kocha.

Badania Kocha nad węglikiem dały pierwszy, prawdziwy dowód związku zakażenia bakteriami patogennymi i konkretnym schorzeniem. W 3-letnich eksperymentach oprócz odkrycia cyklu życiowego *Bacillus anthracis*, rozwinął techniki badawcze, typy hodowli i sposoby barwienia. Ponadto własnymi zdjęciami spod mikroskopu udokumentował doświadczenia nad węglikiem.

9. Fotografowanie mikrobów

Wizualizacja obrazów mikroskopowych stała się kolejnym ważnym zadaniem bakteriologów. Kiedy w 1839 r. odkryto fotografię, wydawało się, że będzie ona tylko użyteczna w dokumentowaniu sztuki. Wcześniej badacze posługiwali się rysunkami. W Europie rozwinęły się dwie techniki Daguerre'a we Francji i Talbot'a w Anglii. Dagerotypia była odbierana jako technika bardziej wyszukana i szybko została zastosowana w archeologii i botanice. Wkrótce fotografia znalazła zastosowanie w medycynie. Koch został wprowadzony w nową technikę przez Cohna i odtąd uważał fotografię za podstawowe narzędzie w dokumentowaniu i porównywaniu mikroorganizmów. Przyjmuje się, że Koch pierwszy wprowadził fotografię do prezentowania bakterii, ich różnych form i postaci. Planował nawet przygotować książkę z fotografiami bakterii, która mogłaby być pomocna przy wykrywaniu i różnicowaniu ich gatunków. Niestety, plan ten nie został zrealizowany. W końcu 1876 r. Koch zaproponował użycie odbitki zamiast fotolitografii. Koch dokonał kilku ulepszeń w mikrofotografii poprzez zmiany w budowie aparatu, ulepszenie mikroskopu

świetlnego i technikę wykonywania odbitek. W 1900 r., w Instytucie Chorób Zakaźnych w Berlinie otworzył pracownię fotografii, gdzie rozwijano techniki fotograficzne. Od tego roku Instytut dokumentuje prace i posiada bogatą kolekcję fotograficzną. Dokonania Kocha w dziedzinie dokumentacji fotograficznej dały podwaliny nowoczesnej mikrobiologii, która rozwinęła się w XX w.

10. Koch – bakteriolog

W 1877 r. Koch opublikował bardzo ważny artykuł o hodowaniu, przechowywaniu i fotografowaniu bakterii. Praca była ilustrowana bardzo dobrymi mikrofotografiami własnego autorstwa. W pracy opisywał metody przygotowywania cienkich rozmazów na szkiełkach i utrwalaniu ich przez łagodne podgrzewanie, a ponadto przedstawił szczegółowo metodykę hodowania bakterii w kropli wiszącej.

Koch postanowił zaprezentować swoje badania Virchowowi, z nadzieją na uzyskanie jego poparcia. Pojechał z Wolsztyna do Berlina, przedstawił wielkiemu patologowi w sposób zwięzły i krotki swoje eksperymenty, otrzymane wyniki i przekazał swój manuskrypt o węgliku. Virchow potraktował nieznanego, prowincjonalnego lekarza chłodno, a nawet lekceważąco, odrzucając z góry, bez dyskusji odkrycia i płynące z nich wnioski, a na koniec wydał bardzo lakoniczną opinię: „to wszystko wydaje się bardzo nieprawdopodobne”. Koch był już wtedy człowiekiem pewnym swoich racji i z dużym dystansem odebrał opinie Virchowa.

Rok później, w 1878 r. Koch opublikował pierwszą monografię podsumowującą swoje badania nad etiologią infekcji przyranych. Była to doskonała praca potwierdzona badaniami *in vivo*, wykazująca zróżnicowaną patogenność bakterii dla odmiennych gatunków zwierząt i wskazująca zwierzęta doświadczalne jako doskonale *medium* do hodowli mikroorganizmów. Wyniki opisał w wydaniu książkowym w 1879 r. „Badania nad etiologią infekcyjnych chorób przyranych”.

Celem kolejnych prac było udoskonalenie techniki mikroskopowania. Koch planował wprowadzić do swojej pracy nowszy system mikroskopii. Wyposażył swój mikroskop kolejno w nowy kondensator Ernesta Abb'ego, maksymalnie skupiający światło na oglądanym przedmiocie i w system immersji olejowej z manufaktury Carl'a Zeissa w Jenie. Należy dodać, że sam Koch dokonał wielu ulepszeń w systemie immersji olejowej i ulepszył przyrząd oświetlający, co pozwoliło mu wykrywać mikroorganizmy znacznie mniejsze niż *Bacillus anthracis*. Ten typ mikroskopu ułatwił mu późniejszą pracę na etiologią gruźlicy.

W 1879 r. za namową Cohna, Koch przeniósł się do Wrocławia, gdzie objął stanowisko lekarza miejskiego.

Niska płaca i brak praktyki prywatnej spowodowały, że po 3 miesiącach powrócił do Wolsztyna. Praca nad węglikiem wymagała ogromnej liczby zwierząt, świnek morskich, królików, żab, przepiórek i wróbli, a kolejno podjęte badania nad nawracającą gorączką, spowodowaną zakażeniem krętkami z rodziny *Spirochaetaceae* wymagały małp. Żona Kocha wraz z córką Trudą musiały karmić i opiekować się zwierzętami. Ośmioletnia praca w Wolsztynie i okolicach sprawiła, że Koch na skutek obcowania z polską ludnością nauczył się mówić po polsku. Z wielu dokumentów wynika, że był ulubionym lekarzem wśród ludności Wolsztyna.

10. Prace w laboratorium nad czystymi kulturami

Koch rozpoczął więc prace nad izolowaniem czystych kultur bakteryjnych. Technika, którą zastosował wydaje się nam obecnie bardzo prosta, trzeba jednak pamiętać, że wtedy, w odległych czasach, w mikrobiologii nie stosował jej jeszcze nikt. Z płynnej hodowli pobierał kroplę zawiesiny i rozprowadzał ją na plastrze ugotowanego ziemniaka, na którym po pewnym czasie obserwował wzrost pojedynczych kolonii. Kolejną techniką, którą opracował i opisał była metoda hodowania bakterii, stosowana powszechnie do dziś. Jest to zakładanie hodowli na pożywkach stałych, na płytkach w celu otrzymania pojedynczych kolonii. Do zestalania pożywek początkowo używano żelatyny, potem agaru. Tę metodę zalecał Koch także do określania liczby bakterii w wodzie, glebie i powietrzu. W 1881 r. opisał technikę hodowania bakterii na płytkach zestalanych żelatyną w artykule pt. „Biblia Bakteriologii”

W 1881 r., podczas VII Międzynarodowego Kongresu Medycznego w Londynie, Koch zaprezentował opracowane przez siebie techniki otrzymywania czystych kultur bakteryjnych. Wśród słuchaczy był Ludwik Pasteur. Józef Lister (1827–1912) obecny również na kongresie i bardzo przyjazny Kochowi, zdecydował się doprowadzić do spotkania obu naukowców. Nie było to zadanie łatwe. Wzajemny antagonizm między Niemcami i Francuzami był bardzo głęboki, a Pasteur nie mógł zapomnieć wojny francusko-pruskiej i swoją głęboką nienawiść jawnie demonstrował.

11. Badania nad gruźlicą

Robert Koch przystąpił do badań nad gruźlicą z pobudek humanitarnych, uważając chorobę za najgroźniejszą klęskę społeczną, wobec której medycyna była właściwie bezradna. Kiedy Koch rozpoczął prace nad etiologią gruźlicy dane epidemiologiczne przedstawiały się następująco: co siódmy zgon w Euro-

pie był spowodowany gruźlicą, a wśród ludzi młodych-dorosłych umierała z tego powodu co 3 osoba. Praca Kocha nad gruźlicą była precyzyjnie zaplanowana i pragmatycznie realizowana. Warto poświęcić im więcej uwagi, szerzej opisując pierwsze doświadczenia.

Pierwszy wycinek tkanki pochodził z autopsji zmarłego na gruźlicę 32 letniego robotnika Heinricha Güntera. Kliniczne objawy chorobowe: kaszel, gorączka, bóle w płucach i wychudzenie wystąpiły u mężczyzny na 3 tyg. przed śmiercią. W 4 dni po przyjęciu do szpitala chory zmarł. Przy pomocy dwóch wygrzanych noży Koch pobrał wycinki z żółtawych guzków gruźliczych i wszczepił je do oczu królików oraz pod skórę świnek morskich. Z zakażonej tkanki wykonał rozmaz na szkiełku i przyjrzał się mu wnikliwie przez mikroskop. Nie zobaczył jednak wiele. Komórki były małe wielkości około 1/3 laseczek węglিকা, zbite w agregaty. Po wielu godzinach moczenia rozmazu w różnych barwnikach, bakterie nabrały wreszcie koloru, który odróżniał je od tła. W tym czasie, wcześniej zakażone zwierzęta zaczęły kolejno padać. Koch dezynfekował ich sierść roztworem sublimatu i wykonywał sekcję obserwując podobne żółte guzki, jak w narządach zmarłego mężczyzny. Mikroskopowe badanie przedstawiało te same blade niebieskie bakterie. Nie było wątpliwości – była to pierwsza identyfikacja bakterii wywołujących gruźlicę.

Teraz Koch chodził do berlińskich szpitali, skąd zbierał próbki tkanek od pacjentów zmarłych na gruźlicę. Zakażał nimi świnki morskie, króliki, polne myszy, szczury, psy, koty, kurczaki i gołębie a nawet świstaki. Zawsze obserwował również zwierzęta zdrowe. Tylko w tkankach chorych ludzi i zwierząt wykrywał pod mikroskopem blade niebieskie bakterie.

Kolejny etap badań wymagał wyhodowania *in vitro* bakterii wywołujących gruźlicę. Koch posiewał wycinki tkanek na bulion i nie uzyskiwał wzrostu. Wniósł zatem, że bakterie gruźlicy mają specjalne wymagania wzrostowe. Zastosował surowicę krwi jako pożywkę. Surowicę rozlewał do wąskich probówek i podgrzewał ją nad płomieniem palnika do momentu przejścia surowicy w galaretkę.

Przygotował więc agar z surowicą pobraną od świinek morskich, wysiewał homogenaty tkanek i umieszczał w inkubatorze. Jest bardzo prawdopodobne, że pierwsza hodowla *in vitro* była przygotowana w szklanym lub porcelanowym naczyniu podobnym do płytek Petriego, do których dodano żelatynę lub skoagulowaną surowicę. Dni mijały i nie wyrastała ani jedna kolonia. Koch był już mocno zniechęcony, gdy po 15 dniach zobaczył przez lupę delikatne kolonie na powierzchni agaru. Powtórzył wielokrotnie doświadczenia uzyskując dostatecznie obfity materiał do inokulacji świnek morskich. Po 6 miesiącach samotnej pracy Koch wyizolował prątki gruźlicy. Ich rola w etiologii gruźlicy

była udowodniona. Potwierdziła się hipoteza, postawiona dużo wcześniej przez Koch, że każda choroba ma swoją specyficzną przyczynę.

12. 24 Marzec 1882 r.

Tego dnia w Towarzystwie Fizjologicznym w Berlinie w małej sali-czytelni, Koch zaprezentował swoje odkrycie. Dokumenty historyczne opisują ten wielki dzień. W piątek 24 marca 1882 r. o 7 po południu Koch rozpoczął prezentację. Historycy podają, że zachował się nawet rękopis jego wykładu, ale jest trudny do odczytania z powodu bardzo drobnego pisma i licznych korekt. Na sali początkowo panował hałas, który stopniowo zmniejszał się, aż w końcu zaległa cisza. Na sali był również Rudolf Virchow, senior niemieckich naukowców. Po prezentacji Kocha bez słowa komentarza opuścił salę i słychać było tylko stukot jego łaški. Paul Ehrlich, wspominał potem, że wieczór ten „był dla niego najważniejszy w całym zawodowym życiu”. Kiedy Koch skończył prezentację na sali zapanowała cisza. Nie było pytań, nie było gratulacji, nie było żadnego aplauzu. Słuchacze oniemieli. Powoli wstawali ze swoich miejsc i podchodzili do mikroskopu, aby spojrzeć na barwione rozmazy na szkiełkach. Po raz pierwszy w życiu zobaczyli na własne oczy prątki gruźlicy.

W pracy Koch udowodnił dwie podstawowe tezy: pierwsza dowodziła, że za pomocą nowej techniki barwienia i dzięki zastosowaniu stałych pożywek, udało się we wszystkich gruźliczo zmienionych narządach znaleźć nowy gatunek bakterii, druga, że przyczyną zmian chorobowych są pałeczki gruźlicy. Następnego dnia pierwsze strony wszystkich gazet donosiły o epokowym odkryciu.

Dla upamiętnienia tego dnia, każdego roku 24 marzec jest obchodzony na całym świecie jako „Dzień walki z gruźlicą”. W tym samym roku 1882 odbył się w Genewie Kongres Higieny, na którym Koch ponownie spotkał Pasteura. Obaj nie wyzbyli się niechęci do siebie. Zazdrość i małostkowość była udziałem dwóch największych bakteriologów na świecie. Przyszła pora na udoskonalenie obrazu mikroskopowego. W 1882 r. Koch szczegółowo opisał przygotowanie rozmazów na szkiełkach, ich suszenie, utrwalanie i barwienie. Nie było to jednak barwienie różnicujące. W pierwszych rozmazach Kocha prątki były widoczne w mikroskopie jako cienkie, blade niebieskie laseczki. Działo się to za sprawą mieszaniny barwnika o następującym składzie: nasycony alkoholowy roztwór błękitu metylenowego, woda destylowana i 10% roztwór ługu potasowego (KOH). Tło było podbarwiane wezuwiną (brąz Bismarka), dzięki której było ono brązowe. Niestety, niebieski barwnik zabarwiał również inne gatunki bakterii.

Wkrótce udało się Ehrlichowi udoskonalić sposób barwienia, wykorzystując cechę kwasooporności prątków. Do dalszego udoskonalenia techniki barwienia prątków przyczynili się dwaj młodzi niemieccy lekarze: Franz Ziehl (1857–1926), neurolog z Lubeki, asystent Kliniki Medycznej w Heidelbergu i Friedrich Carl Adolf Neelsen (1854–1894) – patolog, asystent Instytutu Patologii w Dreźnie (Neelsen zmarł na gruźlicę w wieku 40 lat).

Podziw budzi ogromna praca, jaką czterej badacze wykonali zaledwie w jeden rok i opublikowali 12 sierpnia 1882 r., tj. w 5 miesięcy po słynnej prezentacji Kocha o wykryciu prątków gruźlicy.

Już w następnym roku Franz Ziehl opisał przypadki znalezienia prątków w rozmazach wykonanych z płwocin pobranych od 73 chorych podejrzanych o gruźlicę. Pierwsze wnioski z jego badań brzmią bardzo współcześnie i są aktualne do dzisiaj.

13. Postulaty Kocha

Prątki można uznać za czynnik przyczynowy gruźlicy jeżeli zostaną spełnione cztery warunki:

1. powinno się je znaleźć w każdym przypadku choroby
2. posiane na pożywce muszą wyrastać w postaci czystych kolonii
3. pobrane z hodowli i wprowadzone do ustroju zwierząt wrażliwych muszą wywołać gruźlicę
4. materiał pobrany ze zmian z narządach chorych zwierząt i posiany na pożywki musi dawać czyste kolonie tych samych prątków.

Postulaty Kocha stały się kanonem w diagnozowaniu również innych chorób zakaźnych. Należy dodać, że czynnik etiologiczny trądu *Mycobacterium leprae* powodujący cierpienia milionów ludzi na świecie, wykryty przez Hansena wcześniej niż prątek gruźlicy, nie wypełnia po dziś dzień postulatów Kocha. Jak dotąd nie udało się jeszcze żadnemu badaczowi otrzymać *in vitro* hodowli prątków trądu. Poza trądem, niektóre inne choroby zakaźne nie wypełniają również postulatów Kocha.

14. Prace nad cholera

W 1883 r., gdy Koch był bardzo zajęty pracami na gruźlicą został mianowany liderem zespołu do badania epidemii cholery w Egipcie. Wraz z nim do Aleksandrii przybyli: Gaffky i Bernhard Fischer (1852–1915), przywieziono mikroskopy i zwierzęta doświadczalne. Sprawą wyjaśnienia przyczyny powstałej zarazy zajęli się Koch bardzo skrupulatnie badając chorych i prowadząc prace laboratoryjne. Równocześnie rząd francuski za namową Pasteura, obawiającego się dotarcia epidemii do Europy, wysłał francuską, czteroosobową

grupę badawczą, wśród których byli Emil Roux i Louis Thullier. Ten ostatni, 27-letni lekarz zakaził się cholera i zmarł. Przed swoją śmiercią usłyszał z ust Kocha, że śmiertelny zarazek został zidentyfikowany. Kiedy epidemia wygasła, Koch wrócił do Berlina z licznymi wycinkami zakażonych tkanek. Odkrył małe, ruchliwe, przybierające kształt przecinka, z pojedynczą, biegunową rzęską bakterie (*Vibrio cholerae*), które udało się hodować na pożywkach żelatynowych, potem agarowych, z bogactwem wyciągiem mięsnym.

Wkrótce Koch wyjechał również do Indii w regiony, gdzie choroba występowała endemicznie od dawna. Badania prowadzone w Bengalu potwierdziły odkrycia dokonane w Egipcie.

W wydalinach chorych i ich jelitach znalazł zarazki przecinkowca cholery, opracował metody hodowli, zbadał oporność bakterii na czynniki chemiczne i fizyczne i opisał źródła infekcji, wskazując naturalne i sztuczne zbiorniki wody jako miejsca przeżywania bakterii. W końcowym raporcie z przeprowadzonych w Indiach badań (4 marzec 1884 r.), wskazał na wodę z wiejskich stawów jako źródło epidemii cholery.

Badania nad cholera zakończyły się kolejnym triumfem Kocha, 2 maja 1884 r., z rąk cesarza Wilhelma otrzymał Order II klasy z Gwiazdą, od urzędu miasta 100.000 marek, a Berlińskie Towarzystwo Medyczne wydało z tej okazji uroczysty bankiet. W 1885 r. Koch otrzymał nominacje na profesora higieny i bakteriologii na Uniwersytecie w Berlinie oraz tytuł Tajnego Radcy Medycznego.

15. Tuberkulina

Kolejnym zamiarem Kocha było znalezienie substancji, która mogłaby uodpornić ustrój na zakażenie prątkami gruźlicy lub służyć leczeniu gruźlicy. Prace zmierzające do tego celu rozpoczął w 1890 r. Przeprowadzał dziesiątki eksperymentów na świnkach morskich, podczas których zauważył ciekawe zjawisko, które posłużyło później do stworzenia przez C. Pirqueta pojęcia alergii tuberkulinowej.

Opis pierwszego doświadczenia Kocha brzmiał następująco gdy zakazi się zdrową świnkę morską hodowlą prątków gruźlicy, w miejscu szczepienia powstaje po upływie 14 dni twardy guzek, który wkrótce przechodzi w owrzodzenie, utrzymujące się aż do śmierci zwierzęcia. Równocześnie pojawia się silny odczyn w okolicznych węzłach chłonnych. Inaczej przedstawia się ten sam odczyn u świnki chorej na gruźlicę. Po powtórnym zakażeniu tworzy się w miejscu iniekcji, już w ciągu pierwszych 3 dni naciek, który szybko ulega martwicy. Powstaje płaskie owrzodzenie szybko się gojące. Sąsiednie węzły chłonne nie ulegają żadnym zmianom. Koch obserwując różną reakcję

zwierząt doszedł do wniosku, że prątki gruźlicy mogą spełniać rolę szczepionki chroniącej ustrój przed zachorowaniem. Ustrój broniąc się przed prątkami, powtórnie wprowadzonymi miejscowym stanem zapalnym, nie dopuszcza do uogólnienia zmian chorobowych.

To klasyczne doświadczenie Kocha dało początek nauce o alergii gruźliczej. Dalsze badania doprowadziły do uzyskania tuberkuliny, która stanowiła zagęszczony przesącz zabitej hodowli prątków na bulionie z gliceryną. Taka substancja podawana świnkom morskim, chorym na gruźlicę, powodowała cofnięcie się zmian. Trzeba dodać, że ta prosta metoda była wcześniej używana przez Emile Roux (1853–1933) to wyodrębnienia toksyny dyfteryjnej. Nie wiadomo dlaczego Koch uważał, że wyciąg z zabitych prątków może leczyć gruźlicę. Na wiadomość o pomyślnych wynikach wstępnych badań z tuberkuliną władze niemieckie wywarły na Kocha nacisk, aby wystąpił z nowym odkryciem publicznie. 4 sierpnia 1890 r. Koch zaprezentował badania na X Międzynarodowym Kongresie Medycznym w Berlinie i zreferował wyniki działania tuberkuliny na zwierzęta. Pięć miesięcy później Koch miał również wyniki pierwszych, klinicznych obserwacji u chorych. Prace te prowadzili dwaj lekarze: E. Pfuhl – jego zięć i A. Libbertz, który od 1892 r. nadzorował w firmie Hoechst AG. produkcję tuberkuliny. Wyniki stały się sensacją zarówno w świecie medycznym jak i wśród chorych. Nazwisko Kocha było na ustach wszystkich; osoby prywatne, towarzystwa naukowe i zarządy miast przysyłały gratulacje. Koch otrzymał m.in. list gratulacyjny od Pasteura. Cesarz Wilhelm przyznał mu odznaczenie – Włókno Krzyż Czerwonego Orła.

Powszechnie sądzono, że badania prowadzone przez Kocha nad tuberkuliną zostały całkowicie sprawdzone i ukończone. Zapomniano o wstrzeźliwości i oględnych słowach uczonego, który informował, że badania są zaledwie w fazie początkowej. Rozpoczęły się pielgrzymki chorych, często w beznadziejnym stanie do Berlina. W krótkim czasie berlińskie szpitale, kliniki, hotele, pensjonaty wypełniły się chorymi na gruźlicę płuc. Miasto oddało do dyspozycji Kocha szereg oddziałów szpitalnych. Zagraniczni uczeni przybywali do Berlina, aby na miejscu zapoznawać się z nową metodą leczenia gruźlicy.

Koch, który przez 11 ostatnich lat zajmował się wyłącznie pracą badawczą stał się znowu lekarzem praktykiem. W 1891 r. stworzono dla niego Instytut Chorób Zakaźnych w Berlinie z laboratoriami oddziałem klinicznym liczącym 128 łóżek. Tuberkulina nie spełniła pokładanych w niej nadziei i rozczarowała zarówno lekarzy jak i chorych. W prasie fachowej, głównie angielskiej ukazywały się artykuły krytykujące Kocha za propagowanie tajnego, niebezpiecznego leku.

Do Berlina przybył znany lekarz angielski Artur Conan Doyle (sławny później jako twórca nowoczesnej



Pomnik Roberta Kocha w parku w Wolsztynie
(fot. Z. Zwolska)

powieści kryminalnej). Dotarł do Kocha z trudnością, a po powrocie do Anglii napisał artykuł dyskwalifikujący tuberkulinę jako lekarstwo na gruźlicę. Conan Doyle przewidział jednak możliwość użycia tuberkuliny jako środka diagnostycznego. W styczniu 1891 r. Rudolf Virchow, jak zawsze sceptycznie nastawiony wobec odkryć Kocha, opublikował wyniki badań autopsyjnych 21 chorych leczonych tuberkuliną. Wszyscy chorzy zmarli na gruźlicę prosówkową, a obserwowane zmiany były dużo cięższe, niż patolog kiedykolwiek widział. Te wyniki doprowadziły Kocha do zmiany poglądów na temat leczniczej roli tuberkuliny.

Dzisiaj próby tuberkulinowe należą do powszechnie stosowanych i niezastąpionych metod badania, które nie tylko rozstrzygają o tym, czy badany ustrój przeszedł zakażenie prątkiem gruźlicy (zjawisko to nazwano fenomenem Kocha), lecz także określają natężenie alergii tuberkulinowej. Pierwszymi, którzy zastosowali tuberkulinę do odczynów tuberkulinowych byli C. Pirquet, C. Mantoux, E. Moro i A. Wolf-Eisner. Doznany zawód w badaniach nad tuberkuliną nie zniechęcił Kocha. Nie zrezygnował on z dalszych prac nad gruźlicą, chociaż ostatnie lata badacza upłynęły poza Instytutem i były poświęcone chorobom tropikalnym.

16. Inne choroby zakaźne

W latach 1891–1904 Robert Koch prowadził dalsze badania nad chorobami zakaźnymi.

W 1892 r. cholera dotarła do Hamburga. W ciągu 10 tygodni 18.000 ludzi zachorowało, a 8.200 zmarło. Koch był przekonany, że źródłem zakażeń jest woda zanieczyszczona odchodami ludzkimi. Wraz z asystentami natychmiast zajął się chorymi, badaniami bakteriologicznymi, izolacją łez chorych, dezynfekcją wody pitnej i ekskrementów. Zalecił filtrowanie wody pitnej przez filtry piaskowe, później wprowadził do dezynfekcji wody chloraminę. Trzeba dodać, że Hamburg, stare niemieckie miasto czerpało wtedy wodę bez filtracji wprost z Łaby. Kolejno, Koch rozpoczął pracę w zagranicznych ekspedycjach naukowych, zajmując się chorobami tropikalnymi. W 1896 r. Koch wybrał się w kolejną podróż naukową do Południowej Afryki, gdzie zajął się nieznaną wówczas chorobą bydła, spotykaną również u owiec i świń, powodującą gorączki, zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego i inne objawy. Koch nie odkrył wprawdzie przyczyny choroby zwierząt, ale znacznie ograniczył ich śmiertelność poprzez wstrzykiwanie zdrowym zwierzętom żółci pobranej z woreczka żółciowego chorych zwierząt.

Kolejno pracował: w Indiach nad dżumą, w Afryce nad malarią (*Plasmodium falciparum*) i ciężkimi jej powikłaniami oraz zakażeniami wywołanymi u bydła i koni przez *Trypanosoma evansi*. Powrócił do Niemiec i znów wyjechał do Włoch aby pracować nad malarią. Zarazek malarii (*Plasmodium*) został wykryty wcześniej przez brytyjskiego bakteriologa sir Ronalda Ross'a (1857–1932), laureata Nagrody Nobla w 1902 r. za odkrycie cyklu życiowego *Plasmodium*. Ale to Koch jako pierwszy wprowadził do profilaktyki i leczenia malarii chininę.

Lata 1901–1902 poświęcił się pracy nad tyfusem brzuszny. Jego badania doprowadziły do nowego spojrzenia na tę chorobę. Stwierdził, że jest transmitowana znacznie częściej pomiędzy ludźmi niż z pitnej wody do ludzi. Od tego zaczął się nadzór i prawidłowa walka z tyfusem.

W grudniu 1904 r. Koch wyjechał do niemieckiej Wsch. Afryki badać różne choroby bydła. Przy okazji zajmował się takimi pasożytami, jak *Babesia*, *Trypanosoma*, *Spirocheta* a po powrocie do Berlina prace te kontynuował w laboratorium.

W 1906 r. powrócił do Centralnej Afryki aby pracować nad trypanosomiazą u ludzi (śpiączką afrykańską), śmiertelną chorobą przenoszona przez muchę tse-tse. Koch stwierdził, że atoxyl (arsanilan sodowy) był aktywny wobec pierwotniaków z rodzaju *Trypanosoma*, podobnie, jak chinina wobec malarii. Gdy powrócił z dalekich ekspedycji medycznych, na nowo zajmował się problemem gruźlicy.

Warto dodać, że Koch pracując z wybitnie wirulentnymi mikroorganizmami, bez zabezpieczeń stosowanych i wymaganych dzisiaj, nie uległ żadnemu zakażeniu.

17. Nagroda Nobla

10 XII 1905 r. Robert Koch otrzymał Nagrodę Nobla za całokształt prac badawczych nad gruźlicą.

W śnieżny zimowy dzień, 12 grudnia 1905 r. w Sztokholmie, wygłosił wykład pt.: „O obecnym stanie walki z gruźlicą”. W prezentacji nawiązał do innych uczonych, którzy pracowali nad etiologią gruźlicy, wskazał źródła transmisji prątków, omówił sytuację epidemiologiczną gruźlicy w kilku krajach europejskich, proponując działania jakie należy podjąć aby ograniczyć rozmiar choroby.

Wskazał na konieczność izolowania od otoczenia chorych na gruźlicę, propagowania oświaty zdrowotnej wśród ludzi zdrowych i chorych, profilaktykę i popularyzację wiedzy o chorobie. Jego wykład, oceniany dzisiaj, wydaje się bardzo nowoczesny, a zawarte w nim tezy słuszne. W wykładzie Koch powrócił do kontrowersyjnego tematu gruźlicy odzwierzęcej przyrzekając zająć się ponownie tym zagadnieniem.

Koch, oprócz nagrody pieniężnej (w 1901 r. wynosiła ona 150.800 koron, obecnie 10 mln. koron) otrzymał pięknie zdobiony dyplom wykonany wg projektu Agi Lindegren oraz medal. Należy podkreślić, że dyplomy są niepowtarzalnym dziełem artystów, projektowanym dla każdego laureata oddzielnie.

Oprócz Kocha laureatami byli 2 inni Niemcy fizyk Philipp Edward Anton Lenard (1862–1947) i chemik Johann Friedrich Wilhelm Adolf von Bayer (1835–1917) oraz Polak – Henryk Sienkiewicz (1846–1916), laureat literackiej Nagrody Nobla. Podobizny laureatów znalazły się m.in. na okolicznościowych znaczkach pocztowych. Na jednym z nich możemy zobaczyć R. Kocha w towarzystwie H. Sienkiewicza. Czy Koch rozmawiał z Sienkiewiczem, czy rozmawiał w języku naszego rodaka, nie wiadomo. Uroczystość zakończono bankietem.

18. Odznaczenia i honory

Zasługi Roberta Kocha na polu walki z gruźlicą i innymi chorobami zakaźnymi zostały należycie docenione przez Rząd i naród niemiecki. Kolejno otrzymał następujące tytuły honorowe i odznaczenia:

- Tajnego radcy i nominację na starszego lekarza sztabowego I-klasy
- przyznanie Wielkiego Krzyża Orderu czerwonego Orła
- honorowe obywatelstwo miast Clausthal, Wolsztyna i Berlina

- członkostwa honorowe wielu towarzystw medycznych
- stworzono (dla Kocha) Instytut Chorób Zakaźnych w Berlinie
- Stopień Generała majora od Senatu Akademii Wojskowej Cesarz Wilhelma
- Nagroda Nobla
- Zbiórka społeczna 1.000.000 marek na stworzenie Fundacji R. Kocha
- 1907 władze przyznały Kochowi tytuł Ekscelencji.

Oprócz tego Koch otrzymał wiele innych tytułów i prestiżowych odznaczeń zagranicznych również pośmiertnie.

Po skończeniu 60 lat Koch podjął decyzję przejścia na emeryturę. Otrzymał od przełożonych propozycję pozostania w Instytucie w charakterze konsultanta ds. higieny. Jego następcą był Gaffky, ulubiony uczeń, współpracownik i przyjaciel, który do końca pozostał lojalny wobec Wielkiego Nauczyciela. Oprócz ustawowej emerytury, Kochowi przyznano roczne honorarium w wysokości 10.000 marek. Cesarz odznaczył Kocha Orderem Wilhelma.

Jedno z jego ostatnich wystąpień miało miejsce 7 kwietnia 1910 w Akademii Nauk. Wygłosił wówczas wykład pt.: „Epidemiologia gruźlicy”, w którym podsumował cały dorobek swojej 28-letniej działalności, poświęconej walce z gruźlicą. Na początku maja 1910 będąc już ciężko chorym, zdążył opracować uwagi do projektu nowego szpitala dla chorych na gruźlicę w Berlinie.

Zmarł na kolejny atak serca 27 V 1910 r. siedząc na tarasie w fotelu w hotelu w Baden-Baden. Miał 67 lat. Zgodnie z jego wolą prochy umieszczono w Instytucie Chorób Zakaźnych Roberta Kocha w Berlinie.

19. Muzeum w Wolsztynie

Stowarzyszenie Naukowe im. Roberta Kocha Fundacja im. Roberta Kocha

W Wolsztynie, w domu, w którym mieszkał i pracował Robert Koch powstało muzeum.

Otwarto je 2 maja 1996 r. z inicjatywy Fundacji Polsko-Niemieckiej i Stowarzyszenia Naukowego Roberta Kocha. Muzeum jest kontynuacją otwartej 21 listopada 1958 r. Izby Pamięci poświęconej uczoneму. Z artykułu Z. Domosławskiego dowiadujemy się, że muzeum ma jeszcze dłuższą historię sięgającą 1930 r., kiedy to staraniem władz polskich (jak podają źródła niemieckie) powstało muzeum. Ekspozowane są w nim 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 za-

sługuje wyposażenie laboratorium, z zachowanym mikroskopem 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 Ekszelencja Profesor Robert Koch. Tutaj rozpoczął swoje wspaniałe odkrycia 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 r. Stowarzyszenie, od momentu założenia, organizuje sympozja naukowe i konferencje, upowszechnia wiedzę o życiu i działalności wielkiego uczonego, współpracuje z Instytutem Roberta Kocha w Berlinie.

W 2005 r. Wolsztyn obchodził uroczyste 100-letnią rocznicę przyznania Kochowi Nagrody Nobla. Z tej okazji odbyły się sesje naukowe polsko-niemieckie, ukazało się wydanie specjalne Głosu Wolsztyńskiego po polsku i niemiecku. Kapituła Medalu uhonorowała zasłużone osoby i instytucje Medalami Roberta Kocha.

W 2010 r. w Wolsztynie obył się sesja poświęcona R. Kochowi z okazji 100-letniej rocznicy Jego śmierci. Na uroczystość przyjechali potomkowie Uczzonego i przekazali podarunki z epoki pradziadka do zbiorów muzeum.

Piśmiennictwo

- Bednarski Z.: Robert Koch (1843–1910). *Wiad. Lek.* **36**, 5, 425–427 (1983)
- Bothamley G.H., Grange J.M.: The Koch phenomenon and delayed hypersensitivity: 1891–1991. *Tubercle*, **72**, 7–11 (1991)
- Brock T.: Robert Koch. a life in medicine and bacteriology. Science Tech. Publ., Medison (ed.) Springer Verlag, Berlin 1988
- Burke D.S.: Of postulates and peccadilloes: Robert Koch and vaccine (tuberculine) therapy for tuberculosis. *Vaccine*, **11**, 795–804 (1993)
- Chretien J.: Tuberculosis. The illustrated history of a disease. Hauts de France, Andre Harle-Bethune (ed.), France 1998
- Daniel T.M.: Pioneers of medicine and their impact on tuberculosis. Rochester, NY: University of Rochester Press, 2000; s. 62–97
- Daniel T.M.: Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **9**(11), 1181–1182 (2005)
- Domosławski Z.: Setna rocznica otrzymania Nagrody Nobla przez Roberta Kocha. www.osk.am.wroc.pl
- Fritsche A., Engel R., Buhl D. i wsp.: Mycobacterium bovis tuberculosis: from animal to man and back. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **8** (7): 903–904 (2004)
- Garnuszewski Z.: Nunquam otiosus. *Archiwum Historii Medycyny*, **22**, 3, 391–398 (1959)
- Gradmann Ch.: A harmony of illusions: clinical and experimental testing of Robert Koch's tuberculin 1890–1900. *Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed. Sci.* **35**, 465–481 (2004)
- Gradmann Ch.: Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes and Infection*, **8**, 294–301 (2006)
- Heinrich Hermann: Robert Koch: www.whonamedit.com
- History of oil immersion lenses.: www.smecc.org/history
- Jacob W.R.Jr., Bloom B.R.: Molecular genetic strategies for identifying virulence determinants of Mycobacterium tuberculosis. W: Barry R. Bloom (ed.): Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control. 1994. American Society for Microbiology, Washington, DC 20005.
- Kaufmann S.H., Schaible U.E.: 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol.* **13**(10), 469–475 (2005)
- Kaufmann S.H., Schaible U.E.: 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol.* **13**(10), 469–475 (2005)
- Kielanowski T.: Elementy etiologii gruźlicy człowieka. PZWL, Warszawa 1965.
- Kłoniecki J.: Robert Koch, lekarz powiatowy w Wolsztynie w latach 1872–1880. *Arch. Hist. Med.* **22**, 3, 407–412 (1959)
- Koch Robert. Britannica Nobel prizes www.britanica.com/nobel/micro/html
- Koch R.: Etiologia zachorowań na węglika (1876). Polski Dom Wydawniczy „LAWICA”, Poznań–Wolsztyn 1996.
- Koch R.: The Nobel lecture on how the fight against tuberculosis now stands. *Lancet*, **1**, 1449–1451 (1906)
- Krakówka P.: W 100-lecie odkrycia prątka gruźlicy. *Pneum. Pol.* **50**, 11, 557–558 (1982)
- Kwiatkowski Z.: Robert Koch (1843–1910). W 150 rocznicę urodzin. *Post. Mikrob.* **32**, 3, 104–112 (1993)
- Lechevaier H.A., Solotorovski M.: Three centuries of Microbiology, Science Tech. Publ, Medison (ed.) Springer Verlag, New York 1965.
- Miecznikow E.: The founders of modern medicine. Pasteur, Koch, Lister. Walden Publ., New York 1939
- Miethke-Hertwig J.: Robert Koch pogromca mikrobów. Książka i Wiedza 1960
- Moskwa Z.: Tuberkulina. *Wiad. Lek.* **36** (12), 1034–1035 (1983)
- Moskwa Z.: Odgłosy odkryć Roberta Kocha w polskiej prasie. *Wiad. Lek.* **37**, 12, 975–978 (1984)
- Moskwa Z.: z dziejów gruźlicy w XIX wieku na ziemiach polskich. *Wiad. Lek.* **38** (16), 1185–1190 (1985)
- Münch R.: Robert Koch. Review: on the shoulders of giants. *Microbes and Infection*, **5**, 69–74 (2003)
- Paul Ehrlich – biography. <http://nobelprize.org>.
- Penn M., Dworkin M.: Robert Koch and two visions of microbiology. *Bacteriol Reviews*, **40** (2): 276–283 (1976)
- Robert Koch zum 150. Geburtstag. 1843–1993. Die Deutsche Bibliothek-CIP-Einheitsaufnahme, 1993
- Robert Koch and tuberculosis. Koch's famous lecture. Nobelprize. [org/medicine/educational/tuberculosis/readmore.html](http://medicine/educational/tuberculosis/readmore.html)
- Robert Koch – biography.: <http://nobelprize.org/medicine.laureates>
- Rouillon A.: Who is the man who discovered the Tubercle Bacillus? *Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis. suppl.*, **66**, 71–76 (1990/1991)
- Ryan F.: Tuberculosis. The greatest story never told. Swift Publishers. England 1992
- Skrobacki A.: Robert Koch i aptekarz Józef Knechtel z Wolsztyna. *Farmacja Polska*, **9**–10, 329–333 (1990)

40. Talewski R.: Robert Koch 11.XII.1843 – 27.V.1910. *Pneum. Pol.* 50, **11**, 553–555 (1982)
41. Taylor G.M., Steward G.R., Cook M. i wsp.: Koch's bacillus – a look at first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology*, **149**, 3213–3220 (2003)
42. The Nobel prize in Physiology or Medicine 1905: <http://nobelprize.org>
43. The Nobel Prize: 1901–2001. <http://ec.europa.eu>
44. Venita J.: Paul Ehrlich. *Archiv. Path. Lab. Med.* **125** (6): 725–728 (2001)
45. Winau F., Westphal O., Winau R.: Paul Ehrlich – in search of the magic bullet. *Microbes and Infection*, **6**, 786–789 (2004)
46. Woźniewski Z.: Pierwsze odgłosy w prasie polskiej odkrycia prątka gruźlicy przez Roberta Kocha. *Arch. Hist. Med.* **32**, 3, 399–405 (1959) www.foundersofscience.net/Mollert.htm.
47. Zwolska Z.: Nagroda Nobla po 100 latach. Robert Koch. Międzynarodowa Konferencja PAN. Warszawa 07.11.2005.
48. Zwolska Z.: Robert Koch – twórca bakteriologii chorób zakaźnych. *Medical Tribune*, 2006, (2), 08.02, 21
49. Zwolska Z.: Robert Koch twórca bakteriologii chorób zakaźnych. *Via Media*, Gdańsk 2006
50. Zwolska Z.: Robert Koch – twórca bakteriologii chorób zakaźnych – w 100-lecie Nagrody Nobla. *Pneumonologia*, maj/czerwiec 2007 7–13.

Wykład przedstawiony na Konferencji naukowej „Mikrobiologia 100 lat po Robertcie Kochu”
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Warszawie w dniach 30–31 sierpnia 2010 r.

Ewa Augustynowicz-Kopec^{1*}, Zofia Zwolska¹

¹ Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa ul. Płocka 26

1. Wstęp. 2. Metody bezpośredniego wykrywania *Mycobacterium tuberculosis*. 2.1. Bakterioskopia. 2.2. Metody genetyczne. 3. Hodowla konwencjonalna. 4. Nowoczesne, szybkie i automatyczne systemy hodowli prątków. 5. Identyfikacja w laboratoriach mikrobiologicznych. 5.1. Metody chromatograficzne w identyfikacji prątków. 5.2. Metody genetyczne w identyfikacji prątków. 6. Badania molekularne w epidemiologii gruźlicy. 7. Utajone (latentne) zakażenie prątkami gruźlicy. 8. Podsumowanie

Progress in diagnosis and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*

Abstract: Mycobacteria are reemerging as important causes of human disease. The increase in mycobacterial infections has prompted the development of more rapid and efficient ways of detection and characterization mycobacteria in the clinical microbiology laboratory. Methods currently in use or under development include more sensitive methods for direct detection, improved techniques for culturing, identification, and susceptibility testing, and the use of nucleic acid probes for identification and epidemiological typing. Broad application of rapid and sensitive methods for detection and characterization of mycobacteria is essential if we are to limit the spread of *Mycobacterium tuberculosis* and provide optimal care for patients infected with TB and other *Mycobacterium* species.

1. Introduction. 2. Methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis*. 2.1. Bacterioscopy. 2.2. Genetic methods. 3. Conventional culture methods. 4. Modern, rapid and automatic system for growing mycobacteria. 5. Identification of microorganisms in microbiological laboratories. 5.1. Chromatographic methods for the identification of mycobacteria. 5.2. Genetic methods for the identification of mycobacteria. 6. Molecular epidemiology of tuberculosis. 7. Latent tuberculosis infection. 8. Summary

Słowa kluczowe: bakterioskopia, gruźlica, hodowla, identyfikacja, molekularne dochodzenie epidemiologiczne

Key words: bacterioscopy, tuberculosis, culture, identification, molecular epidemiology

1. Wstęp

Bieżący numer *Postępów Mikrobiologii* jest redagowany w 100-lecie śmierci Roberta K o c h a – odkrywcy prątków gruźlicy, czynnika etiologicznego tej groźnej, zakaźnej choroby. Przy tej okazji należy wspomnieć jak rozwijały się laboratoryjne metody od „czasów Kocha” do dzisiaj.

Robert Koch jako pierwszy bakteriolog odkrył prątki gruźlicy w barwionych wycinkach tkanek pobranych od chorego człowieka a następnie je wyhodował na pożywce przygotowanej ze ściętej surowicy. Od 1882 r. (128 lat temu), tj. od pierwszego raportu R. K o c h a o czynniku przyczynowym gruźlicy mamy możliwość potwierdzać gruźlicę metodami mikrobiologicznymi – barwić rozmazy wykonane z pobranych próbek od chorego i hodować prątki na pożywkach. Te dwie metody były stosowane w laboratoriach na świecie aż do końca lat 1960-tych. Prócz tego zakażano świnkę morską, materiałem od chorego podejrzanego o gruźlicę. Diagnostyka trwała wiele tygodni, na ostateczny wynik trzeba było oczekiwać około 3 m-cy. Próbę biologiczną stosowano przez wiele lat aż do chwili, gdy nie rozwinięły się systemy hodowlane rejestrujące automatycz-

nie metabolizm prątków gruźlicy. Było to w latach 1980-tych i zbiegło się z pojawieniem wirusa HIV co spowodowało nagły wzrost zapadalności na gruźlicę w wielu częściach świata. W Polsce próba biologiczna była stosowana do 1990 r.

Ponieważ początkowo zakażenie wirusem HIV dotknęło najbogatszy kraj świata USA, właśnie tam rozpoczęto intensywne badania nad metodami przyspieszającymi wzrostu prątków i badaniami nad budową genetyczną *Mycobacterium*. Doprowadziło to w latach 1990-tych do poznania genomu prątków i stworzenia nowoczesnej diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy. Każdego roku opisywane są nowe metody, bardziej specyficzne, dzięki którym można wiele skąpoprątkowych przypadków potwierdzić. W ostatnich latach dokonał się też postęp w rozwoju metod serologicznych, w których stosowane specyficzne antygeny dla prątków gruźlicy są pomocne w diagnostyce latentnego zakażenia i aktywnej choroby.

W niniejszym przeglądzie postaramy się omówić przydatność i celowość stosowania klasycznych i nowoczesnych metod w diagnozowaniu chorych podejrzanym o gruźlicę. Problem chorób wywołanych przez prątki gruźlicy u ludzi jest stale aktualny. Wynika to z nadal

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa ul. Płocka 26;
e-mail: e.kopec@igichp.edu.pl

ogromnego rozprzestrzeniania się gruźlicy jako choroby społeczeństw, a nawet narastania częstości jej występowania w wielu regionach świata. Definicja przypadku gruźlicy wg WHO zakłada konieczność mikrobiologicznego potwierdzenia choroby to jest: wyizolowania czynnika sprawczego – bakterii należących do *Mycobacterium tuberculosis* complex, określenia gatunku i wykonania testu lekowrażliwości [11, 13].

Z powodu zagrożenia, jakie powoduje człowiek prątkujący, ważnym zadaniem służb medycznych jest szybkie jego zidentyfikowanie. Wykrycie przyczyny choroby i zastosowanie właściwego leczenia należy do najważniejszych elementów prowadzonych szeroko na świecie programów walki z gruźlicą. Ponadto mikrobiologiczne metody służą do ustalenia optymalnej terapii zgodnej z antybiogramem i monitorowania procesu leczenia chorego.

Od czasu odkrycia prątków gruźlicy wiele wysiłków włożono w udoskonalanie laboratoryjnych metod potwierdzania gruźlicy. Metody znane 100 lat temu przechodziły ciągłe modyfikacje. Ostatnio wprowadzono szereg nowoczesnych technologii opartych na zdobyciach genetyki lub poznaniu składu chemicznego komórki bakteryjnej prątków. Obecnie w laboratoriach stosuje się metody mikrobiologiczne, które są coraz bardziej czułe i pozwalają wykrywać pojedyncze komórki oraz występowanie różnych struktur chemicznych prątków, takich jak DNA lub RNA, elementów insercyjnych genomu, pojedynczych genów (metody genetyczne) lub kwasów mykologicznych (metody chromatograficzne) to jednak zawsze metody konwencjonalne stanowią pierwszy etap diagnostyki.

Wynik badania mikrobiologicznego jest pochodną wielu czynników na każdym etapie pracy, począwszy od decyzji, jaki rodzaj materiału od chorego należy pobrać, poprzez wszystkie etapy diagnostyczne, aż do ostatecznego wydania wyniku i jego interpretacji. Ten ostatni element pracy laboratoryjnej należy do stałych obowiązków kierownika laboratorium i powinien być wyrazem ścisłej współpracy klinicystów i mikrobiologów.

Badanie bakteriologiczne odgrywa bardzo ważną rolę w diagnozowaniu gruźlicy. Mikrobiologiczne diagnozowanie jest procesem trudnym, a trudności wynikają z cech charakterystycznych *Mycobacterium*. Wiele błędów w diagnostyce mikrobiologicznej gruźlicy jest spowodowanych tzw. czynnikiem ludzkim, do których zalicza się brak podstawowych wiadomości o wymaganiach, jakie należy spełnić, aby prawidłowo zdiagnozować chorego. Ponieważ gruźlica dotyczy wielu narządów człowieka, lekarze wszystkich specjalności powinni znać podstawowe techniki diagnostyczne, ich czułość i specyficzność. Powinni wiedzieć, jaki rodzaj materiału od chorego będzie odpowiedni do diagnozowania konkretnego przypadku i w jakich warunkach należy go transportować do laboratorium.

2. Metody bezpośredniego wykrywania *Mycobacterium tuberculosis*

2.1. Bakterioskopia

Badania mikroskopowe są pierwszym etapem mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy i są prowadzone we wszystkich laboratoriach na świecie. Badanie to jest proste w wykonaniu, tanie i specyficzne dla *Mycobacterium*, a wynik jest możliwy do uzyskania po kilku godzinach. Stwierdzenie obecności prątków w płwocinie od chorego, przy równoczesnych symptomach klinicznych lub zmianach radiologicznych upewnia szybko lekarza o procesie gruźliczym i masywności prątkowania. Bakterioskopia ma duże znaczenie z epidemiologicznego punktu widzenia, ponieważ szybko informuje lekarza o prątkowaniu badanego, a chorego, że może być zakaźny dla otoczenia [18, 21].

Badanie rozmazu mikroskopowego nie jest wolne od wad. Podstawową wadą jest jego mała czułość, oceniana w zależności od autorów na 30–70%. Aby zobaczyć pojedyncze prątki w rozmazie barwionym metodą Ziehl-Neelsena próbka materiału klinicznego musi zawierać 5000–10000 komórek prątków w 1 ml. Ponadto w badaniu nie można odróżnić prątków patogennych od saprofitycznych, występujących często, jako naturalna flora bakteryjna organizmu, pochodzących ze środowiska człowieka lub od chorych na mykobakteriozy [26]. Dlatego w nowoczesnym algorytmie postępowania proponuje się przy dodatkowej bakterioskopii wykonać badanie genetyczne, które przyspieszy rozpoznanie prątków gruźlicy [12, 28].

3.2. Metody genetyczne

Możliwość wykrycia *M. tuberculosis* w klinicznych próbkach przy pomocy metod molekularnych zmieniło całkowicie klasyczne metody diagnostyki mikrobiologicznej. Techniki te umożliwiają szybką (w ciągu zaledwie kilku godzin) amplifikację wybranych odcinków genomu bakteryjnego, aż do takiej ilości, jaka jest wymagana do hybrydyzacji ze specyficzną sondą genetyczną.

Jak wspomniano wyżej w nowoczesnym algorytmie proponuje się, aby z bakterioskopowo dodatniego materiału, wykonać badanie molekularne z typową dla *M. tuberculosis* complex sondą. Badanie to trwa 1 dzień i pozwala odróżnić prątkowanie chorego od kontaminacji materiału prątkami środowiskowymi. Tak, więc w ciągu 2 dni można przeprowadzić i zakończyć dwa najważniejsze badania w diagnostyce mikrobiologicznej gruźlicy: wykrycie i identyfikację prątków bezpośrednio w materiale chorego [25]. Najczęściej amplifikowanymi sekwencjami są wstawki insercyjne IS6110, IS986, gen kodujący białko 65kDa i antygeny HPB70

i HPB64 [19]. Według rekomendacji WHO badanie należy wykonywać wyłącznie w zamkniętych, komercyjnie dostępnych systemach genetycznych wyposażonych w kontrole procesów amplifikacji [11].

Testy genetyczne nie powinny nigdy zastępować innych metod, powinny natomiast stanowić ich uzupełnienie. Ponieważ charakteryzują się najwyższą czułością często wyniku dodatniego nie można odnieść do innych metod np. hodowli. Należy wtedy wynik testu genetycznego konfrontować z obrazem klinicznym chorego. Poza tym nie należy zlecać badania genetycznego do laboratorium, które nie ma zaplecza klinicznego, jak również nie dysponuje innymi metodami diagnostycznymi.

Metody genetyczne mogą znacznie przyspieszyć diagnostykę gruźlicy płuc i postaci pozapłucnych. Zgodnie z rekomendacjami CDC diagnostyka *Mycobacterium tuberculosis* powinna być zakończona w ciągu 21 dni od przysłania do laboratorium materiału od chorego. Trudno dzisiaj sobie wyobrazić, aby to kryterium czasu było spełnione przez laboratorium bez stosowania metod amplifikacji kwasów nukleinowych [27].

Większość badań publikowanych obecnie, porównujących czułość i swoistość nowych systemów w diagnozowaniu gruźlicy opiera się na ich porównaniach z hodowlą prątków. Wnioskowanie z takich porównań jest bardzo trudne, ponieważ czułość metod genetycznych jest dużo wyższa niż wszystkich innych metod, w tym również hodowli prątków. Tylko nieliczne prace prezentują przydatność metod genetycznych odnosząc otrzymane wyniki do ostatecznej diagnozy klinicznej chorego wraz z decyzją włączenia leczenia przeciwaprątkowego.

Dlatego wyniki testów genetycznych należy konfrontować z aktualnym stanem klinicznym pacjenta. Decydujące słowo zawsze należy do klinicysty, a badania genetyczne są tylko pomocą w postawieniu diagnozy.

4. Hodowla klasyczna

Hodowla prątków z materiału klinicznego stanowi niezbędny etap w diagnostyce gruźlicy i powinno być zakończone w czasie od 1 do 8 tygodni. Czas jest zależny od rodzaju użytych pożywek, zastosowanych metod homogenizacji, wybiórczych zapotrzebowań pokarmowych prątków izolowanych z tkanki gospodarza oraz zastosowanych metod. Pożywki do hodowania prątków zawierają optymalne zestawy wszystkich substancji wzrostowych koniecznych do rozmnażania. Mimo to, szczepy izolowane od chorych rosną lepiej na jednych pożywkach, gorzej na innych. Czas ich wzrostu zależy przede wszystkim od ilości i żywotności komórek, z jakiej został on pobrany. Jest to szczególnie ważne w przypadku materiałów skąpoprątkowych, które po-

winny być posiewane kilkakrotnie, aby zwiększyć szansę wyhodowania szczepu [24, 26].

Największe walory hodowlane mają płynne pożywki wzbogacone białkiem zwierzęcym. Należą do nich między innymi pożywki Kirchnera, Dubosa, Youmansa. Ich wadą jest podatność na zanieczyszczenia bakteriami Gram-dodatnimi, Gram-ujemnymi oraz grzybami.

W laboratoriach światowych stosuje się powszechnie pożywki konwencjonalne wzbogacane jajami kurzymi: pożywkę Lowensteina-Jensena lub Ogawy lub z kompleksem albuminowym – pożywki agarowe Middlebrook 7H9, 7H10, 7H11 i 7H12. Wszystkie posiadają dodatki substancji hamujących wzrost bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów (zieleń malachitowa, PANTA, penicylina), które na ogół zawsze są obecne w materiałach klinicznych.

Wyhodowanie szczepu *Mycobacterium* ciągle jest uznawane za „złoty standard” w diagnostyce. Jest to metoda o wysokiej czułości (blisko 90%) i specyficzności >98%. Wyniki wszystkich innych stosowanych metod są odnoszone do hodowli jako metody referencyjnej. Metoda hodowli jest bardziej czuła niż bakterioskopia i umożliwia wykrycie prątków obecnych nawet w małych ilościach w materiałach klinicznych (około 1000 komórek/ml). Czas uzyskania hodowli na powszechnie stosowanych w laboratoriach pożywkach L-J wynosi około 10 tygodni. Jest on znacznie krótszy w nowych systemach hodowlanych [29].

5. Nowoczesne, szybkie, automatyczne systemy hodowli prątków

We wszystkich automatycznych systemach hodowli wzrost prątków jest rejestrowany jako reakcja biochemiczna np. oddychanie bakterii, pobieranie tlenu lub wydalanie dwutlenku węgla. Proces jest rejestrowany automatycznie i przeliczany na indeks wzrostu. Wszystkie pracujące w polskich laboratoriach systemy hodowlane zawierają płynną pożywkę Middlebrook'a w różnych modyfikacjach i wymagają zakupu aparatów oraz firmowych zestawów do hodowania, wzbogacania wzrostu, zapobiegających kontaminacji i innych dodatkowych testów [1, 6]. Zaletą tych metod jest możliwość wczesnego wykrycia wzrostu prątków już po 4–6 dniach od założenia hodowli. Testy lekooporności oraz identyfikacji wymagają również tylko kilku dni obserwacji (5–7 dni).

6. Identyfikacja gatunkowa w laboratoriach mikrobiologicznych

Do podstawowych zadań laboratorium prątka należy odróżnienie kompleksów *M. tuberculosis complex* i MOTT. Laboratorium powinno w jak najkrótszym

czasie dać odpowiedź, do jakiego kompleksu należy wyhodowany szczep. Powszechnie stosowane testy różnicujące opierają się na obserwacji cech morfologicznych i wynikach wielu testów biochemicznych i dosyć precyzyjnie identyfikują gatunki. Są jednak pracochłonne i wymagają wielu odczynników, a czas oczekiwania na wynik wynosi około 5–8 tygodni [17, 25].

6.1. Metody chromatograficzne w identyfikacji prątków

Różnice w składzie ilościowym i jakościowym kwasów mykologicznych stanowią podstawę identyfikacji gatunków i podgatunków prątków. Techniki chromatograficzne wymagają specjalnego wyposażenia, ściślego przestrzegania warunków reakcji i doświadczenia w pracy laboratoryjnej. Specyficzność metody, użycie której pozwala zidentyfikować prawie wszystkie znane gatunki prątków kwasoopornych (oprócz odróżnienia *M. tuberculosis* od *M. bovis*) ocenia się na 100% [9].

6.2. Metody genetyczne w identyfikacji prątków

Sekwencje służące do określenia przynależności gatunkowej prątków pochodzą z regionów kodujących 16SRNA. Są one silnie konserwatywne w obrębie gatunków *Mycobacterium*, a przez to wysoce specyficzne. Opracowano sondy do rozpoznawania zarówno DNA, jak i RNA prątków [20].

Identyfikacja przy zastosowaniu specyficznej dla *M. tuberculosis* complex sondy genetycznej jako jedyna metoda pozwala przeprowadzić identyfikację prątków wchodzących w skład kompleksu tuberculosis bezpośrednio w materiale od chorego [5]. Ten test jest bardzo ważny w procedurze laboratoryjnej, ale w Polsce dostępny jest tylko w nielicznych laboratoriach. Wszystkie pozostałe metody biochemiczne i chromatograficzne wymagają wyhodowania szczepu *Mycobacterium*.

7. Badania molekularne w epidemiologii gruźlicy

Typowanie genetyczne prowadzi do ustalenia wzorów molekularnych (*fingerprints*) badanych szczepów *Mycobacterium tuberculosis* i umożliwia ich różnicowanie. Ma to kluczowe znaczenie w ustaleniach dochodzeń epidemiologicznych, a przede wszystkim w zdefiniowaniu źródła i dróg transmisji gruźlicy [22]. Pierwszym warunkiem i podstawą programu zapobiegania rozprzestrzenianiu się gruźlicy i kontroli nad nią jest rozpoznanie i leczenie wszystkich osób z aktywną postacią choroby, kolejnym prześledzenie kontaktów chorego w celu znalezienia wszystkich osób, które poprzez kontakt mogą być narażone na zachorowanie.

Przez szereg lat, z powodu braku odpowiednich metod badawczych, wiedza o epidemiologii gruźlicy była bardzo ograniczona, a śledzenia dróg transmisji prątków gruźlicy w środowisku człowieka prawie niemożliwe. Przed wprowadzeniem metod molekularnych dochodzenia epidemiologiczne opierały się na skrupulatnie prowadzonym wywiadzie lekarskim i porównywaniu wzorów oporności izolowanych szczepów *Mycobacterium tuberculosis*. Słaby poziom diagnostyki laboratoryjnej, nieznanostwo genomu prątków gruźlicy, brak metod molekularnych, powodowały, że w przeszłości, w dochodzeniach epidemiologicznych stawiano się zaledwie hipotezy.

Badania nad transmisją gruźlicy w środowisku człowieka oraz rozpoznanie przypadków aktywnej postaci TB w otoczeniu chorych potwierdzają wysokie ryzyko zakażenia wśród osób pozostających w bliskim kontakcie oraz będących członkami rodzin. Ze względu na niebezpieczeństwo zakażenia wynikające z kontaktów z chorymi, dochodzenia epidemiologiczne powinno objąć wszystkie osoby, u których podejrzewa się gruźlicę lub uzyskano potwierdzenie jej aktywnej postaci [3]. Prześledzenie łańcucha transmisji ma na celu identyfikację wszystkich osób, które powinny zostać objęte leczeniem. Takie dochodzenie wymaga wieloetapowej pracy angażującej wyspecjalizowaną grupę lekarzy, klinicystów, mikrobiologów i genetyków.

Badania takie są niezwykle trudne, wymagają systematycznego śledzenia kontaktów rodzinnych i w bliskim otoczeniu pozarodzinnym, określenia czasu trwania ekspozycji, oszacowania stopnia ryzyka i innych parametrów.

Przełomem w badaniach epidemiologicznych gruźlicy było wprowadzenie nowoczesnych metod typowania molekularnego, opartych o polimorfizm wykrywany w genomie prątków [7, 22]. Źródłem polimorfizmu są w znacznej mierze powtórzone sekwencje DNA, w obrębie, których dochodzi do rekombinacji genetycznej, rearanżacji, mutacji insercyjnych i delecyjnych. Ich liczba oraz zmienność sekwencyjna pozwalają na zdefiniowanie markerów epidemiologicznych [8]. Do najczęściej stosowanych należą sekwencja insercyjna IS6110, polimorficzna sekwencja powtórzona, bogata w pary GC (PGRS *polymorphic GC-rich repetitive sequence*), czy też zmienna liczba powtórzeń tandemowych (VNTR *variable number of tandem repeats*). Każda z metod, wykorzystujących właściwości specyficznych markerów genetycznych, prowadzi do uzyskania charakterystycznego dla danego szczepu wzoru genetycznego, który porównuje się ze wzorami otrzymanymi dla innych szczepów i na takiej podstawie formułuje się tezy dochodzenia epidemiologicznego [10, 19]. Jednym z kluczowych elementów tej analizy jest grupowanie (*clustering*) szczepów na podstawie podobieństwa ich wzorów genetycznych. Przypadki gruźli-

cy, w których wzory typowania genetycznego są identyczne lub bardzo do siebie podobne, uznaje się jako transmitowane pomiędzy ludźmi [4, 2]. Gdy przedmiotem analizy są szczepy izolowane od tego samego pacjenta, w różnych okresach choroby, wówczas identyczne wyniki genotypowania stanowią dowód endogennej reaktywacji definiującej wznowę choroby tym samym szczepem prątków [15]. Z kolei różne wzory genetyczne szczepów przemawiają za zewnątrzpochodną infekcją nowym szczepem, co może mieć istotne znaczenie dla programowania leczenia [23]. Niezwykle ważny z klinicznego punktu widzenia jest też problem zakażeń wewnątrzszpitalnych, których szybkie wykrywanie stało się możliwe właśnie dzięki technikom typowania genetycznego. Przyczyną zakażeń krzyżowych może być sprzęt medyczny na przykład endoskopy, pomieszczenia do pobierania płwociny, w laboratoriach to zjawisko może wystąpić podczas opracowywania materiałów, posiewu na pożywki stałe i płynne, nieprawidłowej pracy w komorze laminarnej, kiedy powstają niekontrolowane aerozole prątków. Zakażenie krzyżowe może zdarzyć się nawet w najlepszych laboratoriach. Ocenia, że od 0,4% do 3,5% wszystkich hodowli w laboratoriach prętka może być wynikiem krzyżowej kontaminacji. Badanie tego zjawiska jest w chwili obecnej możliwe tylko w wysokospecjalistycznych laboratoriach, dysponujących odpowiednimi metodami molekularnymi. Tylko laboratoria stosujące odpowiednie metody genetyczne mogą śledzić to zjawisko i posiadać wiedzę o krzyżowych kontaminacjach.

8. Utajone (latentne) zakażenie prątkami gruźlicy

Przez dziesięciolecia jedynym testem służącym do rozpoznawania latentnego zakażenia prątkami był odczyn tuberkulinowy. Tuberkulina, która jest wyciągiem białkowym z zabitej hodowli prątków została wykryta przez Roberta Kocha już po odkryciu prątków gruźlicy i miała stanowić lek przeciwko gruźlicy. W roku 1890 Koch po raz pierwszy zreferował wyniki prac nad tuberkuliną na kongresie medycznym w Berlinie [5]. Dostyc szybko okazało się, że tuberkulina nie leczy gruźlicy, ale może stanowić test diagnostyczny wykrywający zakażenie organizmu prątkami. Przez długie lata, gdy gruźlica była chorobą powszechnie występującą, test tuberkulinowy był dobrym narzędziem diagnostycznym o czułości zbliżonej prawie do 100% [6]. Później, po wprowadzeniu szczepień BCG zaczęto dostrzegać wady związane z brakiem specyficzności testu. Tuberkulina składa się z wielu antygenów występujących krzyżowo u prątków wchodzących w skład *Mycobacterium tuberculosis complex* w tym również *M. bovis* BCG – szczepu szczepionkowego i u prątków środowiskowych MOTT. Z tego powodu test ten ma obniżoną czułość i jego wynik dodatni nie może

stanowić testu na wykrywanie zakażenia prątkami gruźlicy, szczególnie u osób szczepionych BCG.

Wyniki fałszywie dodatnie, znacznie obniżające swoistość testu były od wielu lat powodem poszukiwania typowych wyłączeń dla *Mycobacterium tuberculosis* antygenów. W ostatnich latach pojawiły się nowe możliwości rozpoznania utajonego zakażenia. Są to testy IGRA (interferon gamma released assays) QuantiFERON-Tb Gold (Cellestis, Carnegie, Australia) oraz T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Wielka Brytania), które są specyficzne i czułe w wykrywaniu zakażenia prątkami [14].

Zasada działania testów opiera się na pomiarze IFN-gamma wydzielanego przez swoiste limfocyty T stymulowane przez antygeny specyficzne dla *M. tuberculosis*, których nie ma w szczepie szczepionkowym *M. bovis* BCG. Są to: ESAT6 (*early secretory antigen target 6*) oraz CFP10 (*culture filtrate protein 10*), w nowszych testach QuantiFERON-Tb Gold *in tube* znajduje się antygen Tb 7,7 również swoisty dla prątków gruźlicy [16]. Wymienione antygeny kodowane są przez specjalny region w genomie *Mycobacterium tuberculosis* nazwany RD1 (tzw. *Region of Difference 1*), obecny tylko u prątków gruźlicy.

Stosowanie testów na wykrywających latentne zakażenia prątkami gruźlicy, jest przydatne u ludzi kwalifikowanych do leczenia antagonistami TNF z powodu przewlekłych chorób zapalnych o podłożu autoimmunologicznym, głównie reumatoidalnego zapalenia stawów, spondyloartropatii seronegatywnych, młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów, choroby Leśniowskiego i Crohna oraz łuszczycy, u których występuje większe prawdopodobieństwo zachorowania na gruźlicę.

9. Podsumowanie

Dostępne w Polsce mikrobiologiczne metody diagnozowania gruźlicy mają swoje wady i zalety. Każda z nich charakteryzuje się innymi wymaganiami aparaturowymi i odmiennymi kosztami. Metody te mogą być ze sobą łączone i mogą się uzupełniać. Zawsze należy przeprowadzić badanie mikroskopowe na obecność prątków kwasoopornych i założyć hodowlę w jednym z automatycznych systemów hodowlanych oraz wykonać badanie genetyczne ze swoistą dla *M. tuberculosis* sondą genetyczną. Te dwa ostatnie badania należą do najbardziej czułych i są szczególnie polecane do diagnostyki chorych podejrzanych o gruźlicę.

W naszym kraju istnieje zorganizowana sieć laboratoriów prętka zajmujących się wyłącznie diagnozowaniem chorych podejrzanych o gruźlicę. Obecnie (w 2010 r.) w Polsce czynnych jest 90 laboratoriów prętka. Tylko kilka z nich dysponuje pełnym panelem badań. Z powodu braku odpowiednich metod nie we

wszystkich laboratoriach można przeprowadzić diagnostykę uznaną za szczególnie trudną, tj z materiałów które są zaliczane do skąpoprątkowych i pochodzą od chorych podejrzanych o gruźlicę pozapłucną, od dzieci, z wycinków po biopsjach, płynu mózgowo-rdzeniowego i innych. Wszystkie laboratoria wykonują dwa podstawowe badania – badanie mikroskopowe i posiew klasyczny, część z nich identyfikuje gatunki prątków i określa ich lekowrażliwość, nieliczne wykonują badania genetyczne. Informację o możliwościach diagnostycznych polskich laboratoriów można uzyskać w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prątka. Należy pamiętać, że nie wszystkie przypadki gruźlicy mogą być potwierdzone badaniem mikrobiologicznym, ale należy dołożyć starań, aby takie potwierdzenie uzyskać. Obecnie w Polsce potwierdza się mikrobiologicznie gruźlicę średnio u 65% (45–90%) chorych.

Piśmiennictwo

1. Augustynowicz-Kopeć E.: Nowoczesne diagnozowanie gruźlicy w systemie izotopowym Bactec 460Tb. Postępy Pulmonologii i Alergologii, red. Milanowski J., Błędowski J. Lublin 1996, 167–78
2. Augustynowicz-Kopeć E., Jagielski T., Kozłowska M., Zabost A., Klatt M., Zwolska Z.: Molecular analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in central Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 605–607 (2008)
3. Augustynowicz-Kopeć E., Jagielski T., Kozłowska M., Zabost A., Zwolska Z.: Znaczenie metody spoligotyping w epidemiologicznych dochodzeniach gruźlicy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **75**, 22–3 (2007)
4. Augustynowicz-Kopeć E., Jagielski T., Zwolska Z.: Genetic diversity of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Poland, assessed by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 4041–404 (2008)
5. Augustynowicz-Kopeć E., Jaworski J., Zwolska Z.: Wykrywanie prątków gruźlicy w materiałach klinicznych metodą genetyczną Gen-Probe Amplified Direct Test. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **70**, 359–367 (2002)
6. Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z.: Przydatność metody fluorescencyjnej Bactec MGIT 960 w mikrobiologicznym diagnozowaniu gruźlicy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **70**, 450–457 (2002)
7. Barnes P.F., Cave M.D.: Molecular epidemiology of tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1149–56 (2003)
8. Braden C.R., Crawford J.T., Schable B.A.: Quality assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. *Emer. Infect. Dis.* **8**, 11 (2002)
9. Butler W.R., Jost K.C., Kilburn J.O.: Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2468–2472 (1991)
10. de Boer A., Borgdorff M.W., de Haas P.E.W., Nagelkerke N.J.D., van Embden J.D.A., van Soolingen D.: Analysis of rate of change of IS6110 RFLP Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J. Infect. Dis.* **180**, 1238–44 (1999)
11. De Kantor I., Kim S.J., Frieden T., Laszlo A., Luelmo F., Norval P.Y., Rieder H., Valenzuela P., Weyer K.: Laboratory services in tuberculosis control. Culture, 1998, Part III. WHO/TB/98.258
12. Drobniewski F.A. i wsp.: Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe. *Europ. Respir. J.* **28**, 903 (2006)
13. Health Protection Agency. *Investigation of specimens for Mycobacteria species*. London, Evaluations and Standards Laboratory, 2006, National Standard Method, BSOP40 Issue 5.
14. Korzeniewska-Koseła M.: Zapobieganie gruźlicy u chorych leczonych antagonistami czynnika martwicy nowotworów. *Reumatologia*, **48**, 4–13 (2010)
15. Lambregts-van Weezenbeek, C.S., Sebek M.M., van Gerven P.J., de Vries G., Verver S., Kalisvaart N.A., van Soolingen D.: Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. *Int. J. Tub. Lung Dis.* **7** 12 suppl. 3, S463–S470 (2003)
16. Mack U., Migliori G.B., Sester M.: L.T.B.I. latent tuberculosis infection or lasting immuneresponse to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur. Respir J.* **33**, 956–973 (2009)
17. Master R.N.: Mycobacteriology. P. 3.01–3.1.6.4. In: Henry D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Volume 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992
18. Mixides G., Shende V., Teeter L.D., Awe R., Musser J.M., Graviss E.A.: Number of negative acid-fast smears needed to adequately assess infectivity of patients with pulmonary tuberculosis. *Chest*, **128**, 108–115 (2005)
19. Smittipat N., Billamas P., Palittapongarnpim M., Thong-On A., Temu M.M., Thanakijcharoen P., Karnkawinpong O., Palittapongarnpim P.: Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loc in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5034–5043 (2005)
20. Somerville W., Thibert L., Schwartzman K., Behr M.A.: Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a Question of Containment. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2996–2997 (2005)
21. Steingart KR., Ng V., Henry M. i wsp.: Sputum processing to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 664–674 (2006)
22. van der Zanden A.G.M., Kremer K., Schouls L.M., Caimi K., Cataldi A., Hulleman A., Nagelkerke N.J.D., van Soolingen D.: Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4628–4639 (2002)
23. van Soolingen D.: Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Inter. Med.* **249**, 1–26 (2001)
24. Zwolska Z.: Zakażenia wywołane przez prątki. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Cianciara J., Juszczyk J. (red.) Wyd. Czelej, Lublin 2007, s. 711–715
25. Zwolska Z.: Diagnostyka mikrobiologiczna gruźlicy i mykobakterioz. W: Choroby wewnętrzne Szczeklik A., (red.) Med. Prakt. Kraków 2005, s. 507–509.
26. Zwolska Z.: Mikrobiologiczne diagnozowanie gruźlicy. *Nowa Klin.* **1**, 10–14 (1995)
27. Zwolska Z.: Mikrobiologiczne metody diagnozowania gruźlicy. W: Gruźlica u dzieci Ceglecka-Tomaszewska K., (red.) PZWL Warszawa, 1996; s. 27–45
28. Zwolska Z.: Współczesne problemy j diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy. *Med. Dypl.* **14**, Supl. 1. Wyd. spec., 49–55 (2005)
29. Zwolska Z.: Wybrane zagadnienia mikrobiologii gruźlicy. W: Choroby infekcyjne układu oddechowego u dzieci Chmielewska-Szewczyk D., (red.). Via Medica Gdańsk, 2001; s. 237–261.

Marian Binek

Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedry Nauk Przedklinicznych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: marian_binek@sggw.pl

1. Wstęp. 2. Wirusy a postulatory Kocha. 3. Kwasy nukleinowe jako źródło informacji genetycznej a postulatory Kocha. 4. Chorobotwórczość versus choroba. 5. Podsumowanie

A glance at Koch's postulates 100 years after his death

Abstract: Koch's postulates were derived from Robert Koch's work on infectious diseases, such as anthrax and tuberculosis. The postulates served the emerging science of microbiology well during its early years, and gave experimental consistency to the investigation of causal relationships. However, significant limitations to the postulates were soon recognized and restricted their wider scientific application. Rapidly, it became apparent that although there are many microbes, most infections were caused by only a few. Some microbes were classified as pathogens although they did not cause disease in every host, and some microbes were considered as non-pathogens although they did cause disease in certain hosts. The description of the carrier state further muddled the existing definitions of pathogens. It was apparent that pathogenicity was neither an invariant nor a stable characteristic of most microbes and that the acquisition of pathogenic microbes was not necessarily synonymous with disease. Now over a century later, a more rigorous method to test causality still has to be developed. Technological advances led to the discovery of viruses, prions and new classes of microbes that cannot be propagated in pure culture and therefore cannot fulfill Koch's postulates. The discovery of nucleic acids as a source of genetic information enforced the revision of guidelines for defining a causal relationship between a microbe and disease and as a result, Koch postulates have modified. Rivers proposed several approaches to establish causal relationship between a virus and a disease, while Falkov recognized the need for more rigorous genetic criteria for the determinants of disease, and modeled his proposals for molecular biology of pathogenesis on Koch postulates. In the integrated theory of microbial pathogenesis the contribution of both host and pathogen are taken into consideration. The outcome of infection is the result of an interplay between host and microbial factors for a particular microbe in a particular host. This interplay permits some microbes to be commensals in some hosts but to cause disease in others. It seems that the host damage is the relevant outcome of that host-microbe interaction. The colonization, persistence and disease represent the continued presence of microbe(s) in the host with a variable degree of host damage. Progressive damage, which results from colonization and persistency, may lead to disease and death. Disease is a clinical manifestation of the damage. The possibility that the occurrence, course and outcome of infection might be influenced at all levels of biological organization was named biocomplexity. This concept blurred the distinction between pathogens and nonpathogens and challenged our thinking about microbial pathogenesis which was based on Koch's postulates. Still at the time when they were formulated the postulates were essential for the progress of knowledge about infectious diseases.

1. Introduction. 2. Viruses versus Koch's postulates. 3. Nucleic acids sequence technology and the difficulties in proving causation. 4. Pathogenicity versus disease. 5. Concluding remarks

Słowa kluczowe: postulatory Kocha, związek przyczynowy, chorobotwórczość versus choroba

Key words: Koch's postulates, causal relationship, pathogenicity versus disease

1. Wstęp

Pomimo dostrzeżanego już wcześniej związku pomiędzy drobnoustrojami i chorobą, bakteryjna etiologia wielu z nich została udowodniona dopiero pod koniec XIX wieku po akceptacji przez ówczesny świat naukowy tzw. postulatów Kocha, zgodnie z którymi taki związek można było udowodnić. Robert Koch był lekarzem i w swojej pracy koncentrował się głównie na kwestiach ontologii chorób, w tym nad doświadczalnym odtworzeniem choroby człowieka na modelu zwierzęcym. Zajmowały go kwestie mające związek z praktyką i w mniejszym stopniu pryncypia składające się na idee naukowe [14, 15, 19, 26, 40]. W 1884 r.,

Friedrich Löffler współpracownik Kocha opisał warunki, jakie musi spełnić drobnoustrój (izolacja, hodowla *in vitro* i zakażenie), aby został uznany za czynnik chorobotwórczy [24]. To odkrycie przypisywane Kochowi, czy raczej Kochowi i Henlemu było przełomem w naukach medycznych ponieważ w oparciu o ustanowione zasady można było wykazać specyficzny związek przyczynowy pomiędzy drobnoustrojem a chorobą.

We współczesnej formie postulatory Kocha można przedstawić w sposób następujący:

1. Mikroorganizm występuje u wszystkich chorych osobników i jest odpowiedzialny za obserwowane zmiany chorobowe i objawy kliniczne,

2. Mikroorganizm nie bierze udziału w wywoływaniu innej choroby i nie stwierdza się go jako czynnika przypadkowego lub niechorobotwórczego,
3. Mikroorganizm po wyizolowaniu od chorego i pasażowaniu w czystej kulturze jest zdolny do wywołania identycznej choroby u nowego osobnika.

Z czasem doszedł jeszcze jeden warunek, mówiący o tym, że ten sam drobnoustroj powinien być izolowany od doświadczalnie zakażonego osobnika, co wynika z logicznych następstw wcześniejszych założeń i sam Koch nie widział potrzeby w szczególności sposobów podkreślania tego warunku [11].

Jeżeli weźmiemy pod uwagę dominujące w XIX wieku poglądy na temat przyczyny chorób, przedstawiane i podtrzymywane przez anatomopatologów, jako zaburzenia wewnętrznej struktury i funkcji ciała, to z tego punktu widzenia idee Kocha były nowatorskie, zmieniające pogląd na rzeczywistość a nie przypadkową rolę drobnoustrojów w wywoływaniu chorób. W swoich założeniach nad bakteryjną etiologią chorób skorzystał z doświadczenia i pracy współczesnych Mu anatomopatologów, przede wszystkim Friedricha Jakoba Henlego, z którym Koch się przyjaźnił, wysuwającego przypuszczenie o zewnętrznych czynnikach chorobotwórczych i Edwina Klebsa skupiającego się na zewnętrznych przyczynach choroby, w tym również na zakażeniu. Swoje przemyślenia na temat przyczyny choroby Koch oparł na doświadczeniu i wynikach pracy nad gruźlicą i wąglikiem, w odniesieniu do których wszystkie sformułowane przez niego postulaty mogły zostać spełnione, ponieważ specyficzny związek pomiędzy drobnoustrojem a chorobą był ewidentny i można go było łatwo wykazać. Bakterie stwierdzano w zmienionych chorobowo tkankach zwierząt i ludzi, można je było uzyskać w czystej kulturze *in vitro* i odtworzyć chorobę w wyniku doświadczalnego zakażenia zwierząt. Co więcej u osobników zdrowych nie stwierdzano obecności tych drobnoustrojów. Przyczynowy związek pomiędzy drobnoustrojem a chorobą mógł być więc jednoznacznie ustalony. Jednakże jeszcze za życia Kocha, zaczęły pojawiać się wątpliwości, czy w oparciu o sformułowane postulaty można zawsze wyjaśnić przyczynę choroby. Sam Koch, mimo że wierzył w specyficzne bakteryjne podłoże takich chorób, jak trąd czy cholera, nie był w stanie w oparciu o sformułowane zasady dowieść, że tak w istocie jest. *Mycobacterium leprae* nawet współcześnie nie udaje się wyizolować w czystej kulturze *in vitro* a więc nie jest możliwe wypełnienie postulatu trzeciego, natomiast bakterie odpowiedzialne za cholere są obecne również u osób zdrowych a więc nie można wypełnić postulatu drugiego [13, 14, 23]. Koch złagodził zatem swoje założenia sugerując, że jeżeli stale stwierdza się występowanie tego samego pasożyta, to należy go uznać

za przyczynę choroby [11]. Spojrzenie na postulaty Kocha z dzisiejszej perspektywy to w gruncie rzeczy spojrzenie na przyczyny chorób przez pryzmat osiągnięć mikrobiologii, nauk bio-medycznych i weterynaryjnych ostatnich ponad stu lat i ewolucji tych dyscyplin w kierunku molekularnej mikrobiologii, genomiki i proteomiki. Odkrycie wirusów i innych subkomórkowych czynników zakaźnych, specyficzny związek niektórych pasożytów z jednym gatunkiem gospodarza, nosicielstwo, powstawanie zmian chorobowych w następstwie uwalnianych przez drobnoustroje toksyn, czy mechanizmów immunologicznych, indukcja ekspresji lub zanik funkcji określonego genu, koinfekcja bakterii i fagów, rekombinacja genetyczna, czynniki ze strony gospodarza, jak odporność, stan fizjologiczny, predyspozycja genetyczna i wreszcie czynniki środowiskowe, w tym rola wektorów, rezerwuaru czynników zjadliwości itp. powodują, że ramy nakreślone przez Kocha dla przyczynowego związku drobnoustroju z chorobą stają się zbyt ciasne i schematyczne. Nie można im jednak odmówić fundamentalnego znaczenia w budowaniu nowoczesnej wiedzy na temat przyczyny chorób zakaźnych, uwzględniającej nie tylko drobnoustroje, ale również ich relacje z gospodarzem w określonym środowisku [4, 8, 11, 16, 23, 37].

2. Wirusy a postulaty Kocha

Wirusy jako subkomórkowe struktury niezdolne do namnażania się poza komórkami z oczywistych powodów nie spełniały postulatów Kocha. Jednakże zgodnie z ogólną ideą ich założeń można było wykazać etiologiczny związek wirusów z chorobą. Wysunięto więc sugestie, że w odniesieniu do specyficznych chorób, nie zawsze możliwe jest ściśle trzymanie się postulatów w celu udowodnienia ich przyczyny. W ślad za tym pojawiły się próby uzupełnienia i modyfikacji postulatów, jak np. podano to w założeniach Riversa z 1936 r., które mówiły że specyficzny wirus w sposób dość regularny wykazuje związek z chorobą i że jego obecność u chorego osobnika nie jest przypadkowa. Stwierdza się go w zmienionych chorobowo tkankach oraz chorobę można odtworzyć u wrażliwego osobnika w wyniku podania materiału wolnego od innych czynników niż wspomniany wirus. Wytwarzanie, w odpowiedzi na zakażenie, specyficznych przeciwciał, wraz z postępującymi objawami zakażenia jest kolejnym dowodem potwierdzającym chorobotwórczą rolę wirusa [29]. R i v e r s zdawał sobie sprawę z tego, że również i przez niego sformułowane zasady nie zawsze będą mogły być spełnione, np. w sytuacjach, w których w próbce używanej do zakażenia wrażliwych zwierząt wirus nie będzie obecny, potencjalnej koinfekcji innymi czynnikami, obecności wirusa w sta-

nie przetrwałym, doprowadzającymi do błędnych interpretacji przyczyny choroby. Przełamał jednak schematyczny sposób myślenia na temat przyczyny choroby wynikający z postulatów Kocha. Kolejne odkrycia w wirusologii, w tym zakażeń przewlekłych i przetrwałych, jak też równoczesnych zakażeń wieloma wirusami nasunęło nowe pytanie, jak w takiej sytuacji określić związek przyczynowy pomiędzy czynnikiem zakaźnym a chorobą [18, 21]. W odpowiedzi, dotychczasowe kryteria zostały uzupełnione o dane epidemiologiczne i mechanizmy patogenezы wirusowych chorób. Przy potwierdzaniu przyczyny choroby było również brane pod uwagę powstanie przeciwciał i odporność w wyniku szczepienia. Kryteria serologiczne i immunologiczne znalazły szersze zastosowanie w postępowaniu dowodowym nad ustaleniem przyczyny choroby z chwilą oczyszczenia antygenу wirusowego i wykrywania specyficznych przeciwciał. Z kolei Alfred Evans na podstawie badań nad wirusem Epstein-Barr (EBV) zaproponował dowody immunologiczne, które miały na celu ustalenie przyczyny choroby [8].

Zgodnie z nimi:

- przed wystąpieniem choroby i ekspozycją na dany czynnik przeciwciała nie występują,
- podczas choroby pojawiają się swoiste przeciwciała klasy IgM i IgG,
- obecność przeciwciał przeciwko danemu czynnikowi zapobiega wywoływaniu przez niego choroby,
- brak przeciwciał powoduje wrażliwość na zakażenie i rozwój choroby,
- przeciwciała przeciwko innym czynnikom nie wpływają na czynnik wywołujący chorobę.

Kolejne wątpliwości co do słuszności i kompletności przyjętych zasad pozwalających ustalić związek pomiędzy czynnikiem zakaźnym a chorobą pojawiły się po odkryciu wirusów powolnych, które nie spełniały nie tylko postulatów Kocha, ale również reguł przyjętych dla wirusów, jako czynników etiologicznych chorób. Johnson i Gibbs zaproponowali więc kolejne kryteria, zgodnie z którymi wirusy można było wiązać z określonym procesem chorobowym, w trakcie którego stwierdzano *in situ* czynnik zakaźny oraz:

- konsekwentnie dochodziło do zakażenia wrażliwych zwierząt lub izolacji wirusa w hodowli komórkowej,
- chorobę z typowymi dla niej objawami klinicznymi i zmianami patologicznymi udawało się odtworzyć w serii doświadczeń w wyniku podania filtratu pochodzącego od osobników chorych, jak również możliwe było doświadczalne zakażenie kolejnymi rozcieńczeniami filtratu w celu wykazania namnażania się czynnika, lub wykazanie po zakażeniu czynnika w zmienionej tkance i komórkach przy pomocy mikroskopu elektronowego, metod immunofluorescencyjnych lub innych,

- równolegle prowadzone badania tkanek niezmiennych lub tkanek pobranych od osobników z innymi chorobami wykazywało, że wykrywany u chorych osobników czynnik nie występował powszechnie lub też nie stanowił zanieczyszczenia [18].

3. Kwasy nukleinowe jako źródło informacji genetycznej a postulaty Kocha

Odkrycie kwasów nukleinowych, a w ślad za tym ich sekwencjonowanie, otworzyło nowe możliwości badań nad różnorodnością mikroorganizmów obecnych w środowisku i związanych z określonymi gospodarzami. Tradycyjne metody izolacji i identyfikacji drobnoustrojów zostają systematycznie zastępowane technikami amplifikacji. Na tej drodze odkrywane są nowe, wcześniej nie znane czynniki zakaźne, które nie udawało się uzyskać *in vitro* lub było to bardzo trudne. W ten sposób wykrywane są również wśród drobnoustrojów sekwencje (geny lub ich fragmenty) odpowiedzialne za wytwarzanie czynników chorobotwórczości i rozwój choroby. Tak więc w postępowaniu mającym na celu ustalenie czynnika będącego przyczyną choroby dochodzimy do zrozumienia istoty chorobotwórczości zapisanej w sekwencji (genie), która jeżeli występuje wpływa na zakażenie i powstanie choroby. Klasyczne postulaty Kocha w tym kontekście wydają się tracić sens ich dalszego przywoływania, w szczególności w sytuacji amplifikacji określonych sekwencji drobnoustrojów bezpośrednio w zmienionych chorobowo tkankach. Jednakże w oparciu i nawiązaniu do nich Stanley Falkov formułuje molekularne postulaty, które określają, jakie cechy powinien mieć gen, aby jego produkt został zaklasyfikowany jako czynnik zjadliwości [9, 10]. Zgodnie z nimi:

- powinien być odnajdywany jedynie w szczepach chorobotwórczych, a jeżeli występuje w genomie szczepów niezjadliwych powinien być zmutowany i nie ulegać ekspresji,
- gen powinien ulegać ekspresji na pewnym etapie zakażenia, a kodowany przez niego produkt indukować odpowiedź immunologiczną humoralną lub komórkową,
- unieczynnienie genu kodującego czynnik zjadliwości powinno (choć nie musi) doprowadzić do obniżenia stopnia zjadliwości,
- wprowadzenie genu do szczepu niezjadliwego może przekształcić go w szczep chorobotwórczy,
- do celów badawczych istnieje możliwość klonowania genu(ów).

Metody genotypowe zyskują powszechną akceptację, jako bardziej specyficzne i łatwiejsze do standaryzacji w porównaniu do tradycyjnych metod fenotypowego rozpoznawania czynników zakaźnych [1, 11,

28, 30]. Zaczęto poszukiwać w genomie fragmentów konserwatywnych, które mogłyby być reprezentatywne dla poszczególnych drobnoustrojów, a także oddawały istotę filogenetycznych przemian. Okazało się, że ribosomowe RNA (rRNAs) mają wiele cech, które spełniają postawione wymagania. Są cząsteczkami relatywnie dużymi o ustalonych funkcjach, obecnymi u wszystkich organizmów. Zawierają wiele regionów, w których sekwencje nukleotydowe we wszystkich komórkach pozostają konserwatywnymi. Znane są trzy cząsteczki rybosomowego RNA, które u *Prokaryota* mają masę 5S, 16S i 23S (stałą sedymentacji mierzoną w Svedbergach. Do analizowania sekwencji najbardziej przydatny jest 16S rRNA, a u *Eukaryota* o podobnej funkcji nieco większy 18S rRNA. Ponieważ 16S i 18S rRNA wchodzi w skład mniejszej (30S lub 40S) podjednostki rybosomu (SSU, small subunit), określenie sekwencjonowanie SSU jest synonimem sekwencjonowania 16S lub 18S RNA [38]. Wykorzystanie SSU rRNA do analizy filogenetycznej zostało zapoczątkowane we wczesnych latach 70 XX wieku przez Carla R. Woese'go na Uniwersytecie Illinois. W 1981 r. Woese wpadł na pomysł aby na podstawie porównania sekwencji genów kodujących 16S rRNA różnych organizmów przeanalizować ich genetyczne pokrewieństwo. Wyszedł z założenia, że skoro wszystkie organizmy mają 16S rRNA i u wszystkich służy on do syntetyzowania białek, to musi to być sekwencja niezwykle konserwatywna. Przez następne lata stworzył olbrzymią bibliotekę sekwencji 16S rDNA różnych organizmów, które można ze sobą porównywać i utworzyć w ten sposób filogenetyczne zależności między nimi składające się na uniwersalne drzewo życia. [39]. Włączenie komputerów do analizy sekwencji rybosomowego RNA w celu odtwarzania filogenetycznych zależności pomiędzy badanymi organizmami (tworzenia drzewa filogenetycznego), spowodowało, że metody te stały się powszechnymi. Nowo rozpoznawane sekwencje są porównywane ze znanymi sekwencjami zgromadzonymi w bazach danych, jak np. RPD (Ribosomal Database Project), GenBank (USA), DDBS (Japonia), czy EMBL (Niemcy). Uniwersalne drzewo filogenetyczne jest więc mapą drogową życia. Przedstawia ewolucyjną historię komórek wszystkich organizmów i w jasny sposób odsłania ten moment w historii ewolucji, od którego wszystkie przejawy życia na Ziemi wzięły swój początek od wspólnego przodka określanego, jako uniwersalny przodek.

16S rRNA stał się więc powszechnie wykorzystywanym celem analizy metodami amplifikacji i określania sekwencji do wykrywania i identyfikacji do poziomu gatunku trudno lub nie hodujących się patogenów bezpośrednio w tkankach zwierząt i człowieka [28, 30]. Co więcej takim drobnoustrojem można było nadać taksonomiczną przynależność i na tej podstawie

przewidzieć właściwości w porównaniu do drobnoustrojów pokrewnych. Oczywiście na podstawie tylko sekwencji, rzeczywista obecność czynnika i jego biologiczna rola pozostawała niejasna, nie było zatem mowy o doświadczalnym odtworzeniu choroby, a więc wypełnieniu 3-go postulatu Kocha. W nawiązaniu jednakże do zasad Falkova, zgodnie z którymi wprowadzenie genu do szczepu niezdolnego skutkującego ekspresją kodowanej cechy niezbędnej do rozwoju choroby, mogłaby wypełniać ten postulat [9, 10].

Zagrożeniem dla metod genotypowych w ustalaniu przyczyny choroby nie było jednak niewypełnienie postulatów Kocha przez identyfikowany nimi czynnik ale ich ekstremalna czułość. PCR wykrywał bowiem po raz pierwszy DNA lub RNA drobnoustrojów na poziomie porównywalnym do zanieczyszczenia nim używanych odczynników, czy wielu anatomicznych miejsc organizmu człowieka czy zwierzęcia [30]. Tak więc technologiczny postęp i powszechne wykorzystywanie amplifikacji i sekwencjonowania napotyka na barierę w postaci trudności z wyeliminowaniem zanieczyszczeń DNA lub RNA nie mających związków z czynnikiem etiologicznym choroby. Co więcej, kiedy sekwencjonowaniu poddaje się produkt amplifikacji otrzymany w próbówce przestaje on mieć anatomiczną ciągłość z procesem chorobowym w tkance i trudniej ten potencjalny związek udowodnić. W nawiązaniu do tego, techniki *in situ* wydają się pewniejsze w dokumentowaniu takiego powiązania. Techniki hybrydyzacji z wykorzystaniem sond dają szansę wykrycia DNA lub RNA bezpośrednio w tkance oraz powiązanie obserwowanych zmian z oddziaływaniem wykrytego czynnika. Techniki te są powszechnie wykorzystywane w diagnostyce mikrobiologicznej połowy lat 80 XX wieku [1]. W gruncie rzeczy wykrywana przez nie sekwencja wskazywała na fizyczną obecność poszukiwanego czynnika w tkankach zwierzęcia czy człowieka. Wynikająca jednak ze stosowania wspomnianych metod trudność w udowodnieniu związku przyczynowego pomiędzy wykrywaną sekwencją a chorobą to brak pewności czy sekwencja ta pochodzi od organizmu żywego czy martwego. Podobnie rzecz się ma w odniesieniu do wykrywanych czynników stanowiących mikroflorę przejściową, komensaliczną, oportunistyczną itp. [4, 35, 37]. Do tego należy również dodać wysokie genetyczne zróżnicowanie niektórych czynników zakaźnych, jak np. wirusów HIV, SNV (Sin Nombre Virus), które tworzą klony pokrewnych jednakże odrębnych wirusów u poszczególnych gospodarzy [21].

Czy zatem w oparciu o metody pozwalające na wykrycie specyficznej sekwencji patogenu można mówić o jego związku przyczynowym z chorobą? Fredricks i Relman sugerują, że tak, jeżeli:

- sekwencja domniemanego patogenu będzie obecna u większości chorych, preferencyjnie w miejscach

- cach i tkankach uznanych za chorobowo zmienne,
- sekwencje kodujące czynniki chorobotwórczości będą nieobecne lub tylko pojedyncze ich kopie można znaleźć u osobników zdrowych,
 - wraz z zanikiem choroby liczba kopii specyficznych sekwencji dla patogenu ulegać będzie obniżeniu oraz wzrości wraz z remisją choroby,
 - sekwencje patogenu wykrywane są przed powstaniem choroby lub ich liczba koreluje z ostrością przebiegu lub natężeniem zmian patologicznych,
 - właściwości drobnoustroju rozpoznanego na podstawie sekwencji są zgodne z właściwościami grupy drobnoustrojów, do których należy,
 - możliwe jest wykazanie korelacji pomiędzy wykrytą *in situ* sekwencją patogenu a zmianami spowodowanymi przez patogen w tkance lub innym miejscu jego przebywania i
 - możliwe jest odtworzenia choroby rozpoznawanej na podstawie wykrycia specyficznych sekwencji patogenu [11].

4. Chorobotwórczość versus choroba

Badania Roberta Kocha i na ich podstawie sformułowane postulaty jednoznacznie udowodniły związek przyczynowy pomiędzy określonym czynnikiem i wywołaną przez niego chorobą. Z drugiej jednak strony przyczyniły się do utrwalenia schematycznego i prostego sposobu myślenia o chorobie, jako wyniku oddziaływania jednego szczególnego czynnika [3, 16, 17]. Powiązanie przyczyny choroby z jednym czynnikiem wynikało z pracy Kocha nad takimi chorobami zakaźnymi, do których ustanowione postulaty się odnosiły, jak np. gruźlica czy węglik. Zgodnie z tym założeniem węglik jest wywołany tylko przez laseczkę węglikową, gruźlica przez prątki gruźlicy a dur brzuszny przez pałeczki duru. Schemat zaproponowany przez Kocha pokazywał, że dana choroba nie wystąpi, jeżeli nie będzie domniemanego czynnika przyczynowego i nie zaistnieją wynikające z postulatów szczególne warunki do jej powstania [15, 26]. Taki model myślenia dominował w medycynie XIX wiekowej i początku XX w. W odpowiedzi na pojawiające się z czasem pytania o przyczynę chorób, szczególnie niezakaźnych, jak np. cukrzyca czy chorób nowotworowych, dynamicznie rozwijająca się epidemiologia dość szybko weryfikuje jednoczynnikowy model przyczyny choroby na rzecz wielu czynników [3, 6, 12, 17, 22, 25].

Już w początkach XX wieku stawało się jasne, że określenie chorobotwórczy w odniesieniu do drobnoustroju nie jest synonimem wywołujący chorobę. Okazywało się bowiem, że w przypadkach epidemii niektórych chorób, czynniki je wywołujące były izo-

lowane zarówno od chorych z objawami choroby, jak i osobników asymptomatycznych. Klasycznym przykładem obrazującym wspomniane zjawisko jest zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych spowodowana przez *Neisseria meningitidis*. Podczas epidemii tej choroby chorobotwórcze oddziaływanie bakterii ujawnia się tylko u niewielkiego odsetka osobników zakażonych. Większość pozostaje zdrowa, chociaż wspomniane bakterie u nich występują. Podobnie rzecz się ma w odniesieniu do chorobotwórczych gronkowców i paciorkowców obecnych u wielu osób, które jednak nie wykazują objawów chorobowych [2, 4, 37]. Jeszcze w początkach XX wieku, Kolber proponował nazywać taki stan sub-zakażeniem, znanym również, jako nosicielstwo [20]. Przykłady te pokazują, jak niejasne są pojęcia chorobotwórczy, niechorobotwórczy, jak również ograniczona pozostaje koncepcja patogeny choroby w oparciu o postulaty Kocha, zgodnie z którymi czynnik chorobotwórczy nie powinien być obecny u osobników, którzy objawów choroby nie wykazują. Stan nosicielstwa tłumaczono pewną formą adaptacji drobnoustroju do gospodarza w wyniku, której u tego ostatniego nie dochodziło do powstawania zmian chorobowych, natomiast drobnoustrój wykazywał pewną formę odporności na czynniki immunologiczne. Z czasem okazało się, że taki drobnoustrój indukuje odpowiedź immunologiczną, co uznano za zjawisko korzystne, ponieważ doprowadzało ono do ochrony przed rozwojem ostrej formy choroby. Na przykładzie *Salmonella Typhi* okazało się jednak, że nosicielstwo może przechodzić w aktywne zakażenie, co pokazuje, że obecność określonych drobnoustrojów u gospodarza stanowi ciągle zagrożenie chorobą. Nawet współcześnie, mechanizmy nosicielstwa nie są do końca zrozumiałe. Przyjmuje się, że jest to wielopłaszczyznowe, podlegające regulacjom na wielu poziomach oddziaływanie pomiędzy gospodarzem i drobnoustrojem, doprowadzające do zachowania pewnej równowagi w wyniku, której nie dochodzi do rozwoju choroby ale również nie dochodzi do eliminacji drobnoustroju [4, 27, 34]. Pod koniec XX wieku wyniki badań na poziomie molekularnym dostarczyły dowodów na genomowe zróżnicowanie patogenów i niepatogenów. W większym stopniu, wynikającymi z tego właściwościami drobnoustrojów, próbowano tłumaczyć mechanizmy patogeny niż relacjami pomiędzy drobnoustrojami a gospodarzem. Podział na organizmy patogenne i niepatogenne był zasadny i zrozumiały w odniesieniu do klasycznych czynników etiologicznych chorób zakaźnych w minionych czasach. Powszechne wprowadzenie sanitacji, szczepień, surowic odpornościowych, czy chemioterapii, praktycznie spowodowało wyeliminowanie klasycznych patogenów i problemu chorób zakaźnych w przeważającej części świata. Wprowadzenie jednak terapii kortykosteroidowej, środków cytotoksycznych,

upowszechnienie transplantologii i chirurgii inwazyjnej a także katastroficzna epidemia HIV i podobnych wirusów u zwierząt i człowieka, spowodowały wzrost populacji osobników z osłabionym układem immunologicznym, wrażliwych na zakażenia drobnoustrojami uważanymi wcześniej za niechorobotwórcze [2, 4, 5, 22, 31, 32]. Do dominacji określonych patogenów przyczyniła się również selekcja antybiotykowa bakterii prowadzona od lat 40 XX wieku [5, 7]. Zjawisko to na przykładzie czynników etiologicznych zakażenia krwi u człowieka można przeanalizować następująco: początkowo w zakażeniach krwi dominowała mikroflora Gram-dodatnia, która następnie została wyparta przez bakterie Gram-ujemne, aby ponownie pod koniec XX wieku powróciły zakażenia drobnoustrojami Gram-dodatnimi i grzybami.

Wraz z udziałem w zakażeniach u określonych gospodarzy drobnoustrojów uważanych za niechorobotwórcze na znaczeniu straciło szereg definicji ukutych wcześniej dla określenia zależności pomiędzy gospodarzem i drobnoustrojem, jak np. mikroflora saprofityczna, komensalizm a pojawiło się szereg nowych, jak np. zakażenia szpitalne, jatrogenne, bezobjawowy nosiciel, nowe (emerging) i powracające zakażenia (reemerging) [4, 33, 34].

Komensalizm definiowany, jako forma oddziaływania pomiędzy drobnoustrojem a gospodarzem w wyniku, której nie dochodzi do dostrzegalnych, przynoszonych gospodarzowi szkód nie zawsze udaje się w takiej formie obronić. Drobnoustroje, które stanowią mikroflorę komensaliczną pojawiły się we wczesnym okresie życia gospodarza, kiedy jego niedojrzały układ immunologiczny nie był w stanie stworzyć przeciwko nim efektywnej bariery. Tym niemniej drobnoustroje te pobudzają do odpowiedzi układ immunologiczny gospodarza i być może dzieje się tak na skutek niedostrzeganego uszkodzenia przez nie tkanek, na których bytują. Niektóre z nich uważane za komensaliczne, jak np. *E. coli*, czy *C. albicans*, które wcześniej zasiedlają określone nisze u noworodków mogą również doprowadzać do zakażenia i chorób. Przykładem niech będzie zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych spowodowane przez *E. coli* w pierwszym miesiącu, czy zakażenia *C. albicans* w pierwszym roku życia noworodków człowieka [4, 35, 37].

Pojawiły się również trudności, szczególnie wobec decyzji o podjęciu antybiotykoterapii, w odróżnianiu patogenów od czynników naturalnie zasiedlających określone nisze ekologiczne. Można to prześledzić również na przykładzie *Candida albicans*, którego występowanie w wielu różnych miejscach organizmu gospodarza to zakażenie czy tylko refleks zasiedlania? [2, 4, 5]. Podobnie obecność *Pseudomonas aeruginosa* w środowisku intensywnej terapii to zanieczyszczenie, czy zasiedlenie przez bakterie określonego środowiska?

[7] W przypadku zakażenia z reguły podejmuje się terapię, unika się natomiast takiej interwencji w odniesieniu do mikroflory zasiedlającej, obawiając się ubocznych skutków podjętego postępowania, w tym głównie indukcji lekooporności. Różnicowanie na patogeny i mikroflorę zasiedlającą jest trudne w sytuacji izolacji drobnoustrojów np. z rany, czy miejsc, które naturalnie pozostają sterylne. Wynika to często z niedostatecznej wiedzy na temat mikroflory zasiedlającej w patogenezie określonej choroby i relacji pomiędzy drobnoustrojem i gospodarzem podczas rozwoju zakażenia [2].

Do tego dochodzi jeszcze kolejny termin dla określenia mikroflory kolonizującej, definiowany, jako zdolnej do zasiedlania określonych nisz w zróżnicowanym czasie, w trakcie, którego powodowane uszkodzenia tkanek są znaczące. Z kolei długotrwała kolonizacja w wyniku, której dochodzi do powstania zmian patologicznych nazywana jest zakażeniem przetrwałym i przykładem może być powstawanie ziarniniaków w wyniku zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* [4].

Tak więc komensalizm, kolonizacja i zakażenie przetrwałe w trakcie jego trwania, można uznać za pewne formy zakażenia, które łączy jedna cecha, tj. zdolność drobnoustrojów do wywoływania zróżnicowanych, od bardzo nieznacznych do istotnych uszkodzeń w organizmie gospodarza. W trakcie kolonizacji w wyniku namnażania się drobnoustrojów stopień uszkodzeń może być odpowiednio wyższy co z kolei w większym stopniu indukuje reakcję obronną gospodarza doprowadzając czasami do eliminacji drobnoustrojów, kończąc stan kolonizacji. Podobne efekty uzyskuje się w wyniku prowadzonej chemioterapii czy immunizacji. W sytuacji jednak braku eliminacji drobnoustrojów rozwija się stan zakażenia przetrwałego, czasami prowadzący nawet do śmierci na skutek postępującego uszkodzenia tkanek.

W koncepcji patogenu wysuniętej przez Casadevall i Pirofski podkreśla się, że jest to czynnik zdolny do wywoływania zmian patologicznych, których rozległość zależna jest od reakcji obronnej gospodarza [4]. Istotą zakażenia są zatem zmiany patologiczne będące wynikiem reakcji pomiędzy drobnoustrojem i gospodarzem, które często są niezbędne do indukcji specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Istotą choroby jest natomiast kliniczne manifestowanie się uszkodzeń powstałych w wyniku interakcji pomiędzy drobnoustrojem i gospodarzem. Uszkodzenia i manifestowanie się zmian może mieć również miejsce po wyeliminowaniu drobnoustroju, np. w wyniku chemioterapii. Tak się dzieje na skutek reakcji organizmu np. na endotoksynę *E. coli* uwolnioną w wyniku śmierci komórek tych bakterii, czy w wyniku indukcji immunologicznych mechanizmów prowadzących do autoagresji, jak np. ma to miejsce w następstwie zakażeń mykoplazmami czy paciorkowcami (reumatyczne uszkodzenie

stawów i zastawek serca). To powoduje, że objawy choroby utrzymują się dłużej, nawet po formalnym usunięciu wywołujących ją czynników. W sensie klinicznym choroba ma więc ścisły związek z uszkodzeniami w organizmie gospodarza i indukcją odpowiedzi immunologicznej w wyniku bezpośredniej reakcji komórek układu odpornościowego z antygenami patogenu [4, 34].

W rozważaniach nad zakażeniem i chorobą należy również podkreślić w tym procesie rolę samego gospodarza i sprawność jego mechanizmów obronnych [22]. To powoduje bowiem, że te same drobnoustroje u jednego będą stanowiły florę komensalną, a u drugiego będą doprowadzały do rozwoju zakażenia i manifestowania się jego objawów. Oddziaływanie określonych czynników zjadliwości drobnoustrojów będzie ściśle uzależnione od wrażliwości na nie i potencjalnych możliwości ich neutralizowania przez określonego gospodarza. Jeżeli ponownie przywołamy w tym celu *C. albicans*, jako przykład drobnoustrojów komensalnych u jednych gospodarzy, to te same drobnoustroje u osobników z zaburzeniami odporności, leczonych długotrwale antybiotykami, czy noworodków z niedojrzałym układem immunologicznym będą powodowały zakażenie. Wydaje się, że jedyną cechą, którą stale możemy odczytać z relacji towarzyszących drobnoustrojowi i gospodarzowi jest potencjalne uszkodzenie komórek i tkanek gospodarza przez drobnoustroje. Jego stopień wyznacza definicje tej zależności, którą możemy określić komensalizmem, kolonizowaniem organizmu przez drobnoustroje czy zakażeniem. Konsekwencją tych zależności jest choroba, w której obraz czynnika patogenego i niepatogenego jest zaciemniony i niezgodny z koncepcją mikrobiologicznej patogenezы chorób zbudowaną w oparciu o postulaty Kocha [4, 11, 27].

5. Podsumowanie

Pionierskie badania Roberta Kocha przyczyniły się do opracowania metody, dzięki której można było wykazać związek etiologiczny pomiędzy czynnikiem zakaźnym i odpowiadającą mu chorobą [24, 40]. Wkrótce okazało się, że tzw. postulaty Kocha mają ograniczenia metodyczne i epistemologiczne. Tym niemniej przez kolejne dekady, jak również i w czasach nam współczesnych w większym lub mniejszym stopniu w oparciu o nie zależności takie staramy się ustalać. O tym, że nie w każdym przypadku drobnoustroje spełniają ustanowione reguły wkrótce przekonał się sam ich Twórca podczas pracy nad przecinkowcami cholery, które wykrywano również u ludzi zdrowych, co było niezgodne z postulatem drugim. Z czasem zaczęto tworzyć wyjątki od zasad Kocha np. w odniesieniu do mikroorganizmów, które ich nie spełniały. W ten sposób wyróżniono drobnoustroje,

które nie hodują się na sztucznych pożywkach, wiele drobnoustrojów, których nie można od siebie odróżnić na podstawie charakterystycznych objawów chorobowych ponieważ wszystkie powodują taką samą chorobę, jak np. zapalenie nerek, czy wreszcie drobnoustroje, z których każdy może powodować wiele chorób, jak np. *Streptococcus pyogenes* odpowiedzialny za anginę, szkarlatynę, różę itp. [17, 34].

Dalsze prace nad *Vibrio cholerae* i odkrycie środowiskowego rezerwuaru tych bakterii w śluzowej otoczce niebiesko-zielonych alg a także wpływu na ich namnażanie się temperatury wód oceanicznych i zmian klimatycznych wpłynęły na opracowanie bio-kompleksowego modelu ryzyka wystąpienia cholery. Uwzględnił on molekularne podłoże chorobotwórczości bakterii, ale również wiązał wystąpienie choroby z socjalno-bytowymi uwarunkowaniami ludzi i zmianami klimatycznymi [23]. Tak więc cholera po ponad 100 latach od ustanowienia postulatów Kocha stała się przykładem bio-kompleksowego podejścia do ustanowienia związku przyczynowego pomiędzy chorobą a drobnoustrojem. W podejściu Kocha i jemu współczesnych do przyczyny choroby, dominuje przekonanie o ważności pojedynczego drobnoustroju lub jego toksycznego produktu. Okrycie biofilmów uświadomiło badaczom rolę w tym procesie konsorcjów drobnoustrojów czy polimikrobiologicznych kompleksów będących swego rodzaju protokankami i w takiej formie uorganizowania uczestniczącymi w procesach patofizjologicznych [3, 6, 17, 25]. Nie zawsze przy takiej formie organizacji drobnoustrojów daje się zauważyć związki przyczynowe pomiędzy jednym gatunkiem bakterii i zakażeniem obejmującym jedną specyficzną tkankę. Wydaje się, że kolejny przełom w myśleniu o przyczynie choroby zakaźnej spowodowany jest wykryciem czynników gąbczastych encefalopatii. Prionowa hipoteza tych chorób stanowi pewnego rodzaju test dla przyjętego współcześnie modelu analizy przyczyny choroby budowanej na podstawie wielu przesłanek, jak np.:

- odtwarzalnej korelacji pomiędzy czynnikiem etiologicznym a objawami klinicznymi, zmianami patologicznymi i epidemiologią zakażenia,
- pewnego stanu zgodności pomiędzy przewidywaną na działanie danego czynnika reakcją z faktyczną reakcją demonstrowaną ze strony gospodarza,
- postępującego kumulowania się zmian, jako konsekwencji procesów patofizjologicznych toczących się w organizmie, czy
- zahamowania procesów patofizjologicznych w wyniku podjętej interwencji biomedycznej [36].

W kontekście wieloprzyczynowej teorii powstania choroby czynnik biologiczny jest tylko czynnikiem inicjującym postępujące dalej i kumulujące się zmiany.

Piśmiennictwo

1. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H.: Phylogenic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143–169 (1995)
2. An G, Shapiro M., Crandall M., Issa M., West M.: Critical illness as ecological collapse: modeling the impact of stress, ischemia, and therapy on host-bacterial ecology of the gut. *Surg. Infect.* **9**, 277 (2008)
3. Broadbent A.: Causation and model of disease in epidemiology. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **40**, 302–311 (2009)
4. Casadevall A., Pirofski L.A.: Host-pathogen interactions: Basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* **68**, 6511–6518 (2000)
5. Clatworthy A.E., Pierson E., Hung D.T.: Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 161–167 (2007)
6. Colwell R.W.: Biocomplexity. The 99th Annual General Scientific Meeting of the American Society for Microbiology, McCormick Place, Chicago, IL, 1999.
7. Eachempati S.R., Hydo L.J., Barie P.S.: Does de-escalation of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia affect the likelihood of recurrent pneumonia or mortality in critically ill patients? *J. Trauma.* **66**, 1343–1348 (2009)
8. Ewans A.S.: Limitation of Koch's postulates. *Lancet*, **ii**, 1277–1278 (letter) (1977)
9. Falkov S.: Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis.* **10** (suppl. 2), 274–276 (1988)
10. Falkov S.: Molekular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity—a personal recollection 15 years later. *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 67–72 (2004)
11. Fredricks D.N, Relman D.A.: Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 18–33 (1996)
12. Garcion E., Naveilhan P., Berger F., Wion D.: Cancer stem cells: beyond Koch's postulates. *Cancer Lett.* **278**, 3–8 (2009)
13. Gerber R.H., Rea T.H.: *Mycobacterium leprae* (Leprosy, Hansen's disease). In Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin T. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 5th ed. Churchill Livingstone, New York, 2000, s. 2608–2616
14. Gradmann C.: Robert Koch and the pressure of scientific research: tuberculosis and tuberculin. *Medical History*, **45**, 1–32 (2001)
15. Gradmann C.: A matter of methods: the historicity of Koch's postulates 1840–2000. *Medizinhist. J.* **42**, 121–148 (2008)
16. Hanson R.P.: Koch is dead. *J. Wildlife Dis.* **24**, 193–200 (1988)
17. Inglis T.J.I.: Principia aetiologica: taking causability beyond Koch's postulates. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1419–1422 (2007)
18. Johnson R.T., Gibbs C.J.: Koch's postulates and slow infections of nervous system. *Arch. Neurol.* **30**, 36–38 (1974)
19. Kaufmann S.H.E., Schaible U.E.: 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends in Microbiol.* **13**, 469–475 (2005)
20. Kolmer J.A.: Infection. In Infection, immunity and biologic therapy. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa., 1924, s. 58–83
21. Ksiazek T.G., Peters C.J., Rollin P.E., Zaki S., Nichol S., Spiropoulou C., Morzunov S., Feldmann H., Sanchez A., Khan A.S.: Identification of a new North American hantavirus that cause acute pulmonary insufficiency. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**, 117–123 (1995)
22. Levin B.R., Antia R.: Why we don't get sick: the within-host population dynamics of bacterial infections. *Science*, **292**, 112–115 (2001)
23. Lipp E.K., Huq A., Colwell R.R.: Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 757–770 (2002)
24. Loeffler F.: Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe. *Mitth. A. d. Kaiserl. Gesundheitsamtes*, **2**, 421–499 (1884)
25. Mortimer P.P.: Five postulates for resolving outbreaks of infectious disease. *J. Med. Microbiol.* **52**, 447–451 (2003)
26. Munch R., Biel S.S.: Expedition, experiment and expertise reflected in Robert Koch's assets. *Sudhoffs Arch.* **82**, 1–29 (1998)
27. O'Toole D.: Monitoring and investigating natural disease by veterinary pathologists in diagnostic laboratories. *Vet. Pathol.* **47**, 40–44 (2010)
28. Relman D.A.: Detection and identification of previously unrecognized microbial pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 382–389 (1998)
29. Rivers T.M.: Viruses and Koch's postulates. *J. Bacteriol.* **33**, 1–12 (1937)
30. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487–491 (1988)
31. Seal J.B., Morowitz M., Zabornia O., An G., J.C. Alverdy.: The molecular Koch's postulates and surgical infection: a view forward. *Surgery*, **147**, 757–765 (2010)
32. Shapiro J.A.: Bacteria are small but not stupid: cognition, natural genetic engineering and socio-bacteriology. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **38**, 807–819 (2007)
33. Stephens D.S., Moxon E.R., Adams J., Altizer S., Antonovics J., Aral S., Berkelman R., Bond E., Bull J., Gauthen G., Farley M.M., Glasgow A., Glasser J.W., Katner H.P., Kelley S., Mittler J., Nahmias A.J., Nichol S., Perrot V., Pinner R.W., Schrag S., Small P., Thrall P.H.: Emerging and reemerging infectious diseases: a multidisciplinary perspective. *Am. J. Med. Sci.* **315**, 64–75 (1998)
34. Tanz R.R., Shulman S.: Streptococcal pharyngitis: the carrier state, definition, and management. *Pediatr. Ann.* **27**, 281–285 (1998).
35. Tannock G.W.: The normal microflora: an introduction. In G.W Tannock (ed.). Medical importance of the normal microflora. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 1999, s. 1–23
36. Walker L., Le Viene H., Jucker M.: Koch's postulates and infectious proteins. *Acta Neuropathol.* **112**, 1–4 (2006)
37. West S.A., Griffin A.S., Gardner A., Diggle S.P.: Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 597–607 (2006)
38. Wilson K.H., Blitchington R.B., Greene R.C.: Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1942–1946 (1990)
39. Woese C.R.: Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221–271 (1987)
40. Zwolska Z.: Robert Koch – twórca bakteriologii chorób zakaźnych. Wyd. Via Medica, Gdańsk, 2006

Rafał Gierczyński

Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791, Warszawa; e-mail: rgierczynski@pzh.gov.pl

1. Wprowadzenie – wąglik wczoraj i dziś. 2. Wąglik: rezerwuuar, objawy, leczenie i zapobieganie. 2.1. Wąglik – występowanie dawniej i obecnie. 2.2. Wąglik jako broń biologiczna i czynnik terroryzmu. 3. Charakterystyka i czynniki chorobotwórczości laseczki wąglika. 3.1. *Bacillus cereus* ssp. *anthracis*? 4. Identyfikacja laseczki wąglika. 5. Rozwój metod typowania szczepów laseczki wąglika. 5.1. MLVA. 5.2. SNR. 5.2. canSNPs. 6. Filogeneza i molekularna epidemiologia laseczki wąglika. 6.1. Zróżnicowanie szczepów *B. anthracis* w skali globalnej. 6.2. Zróżnicowanie izolatów *B. anthracis* w epidemiach lokalnych. 7. Charakterystyka molekularna szczepów laseczki wąglika w Polsce. 8. Podsumowanie

Diagnostics and molecular epidemiology of *Bacillus anthracis*

Abstract: Although anthrax is rare in developed countries liable *B. anthracis* spores still remain in a soil in these European countries, where few decades ago the disease occurred yearly. In Poland anthrax was endemic for centuries. This has triggered vast genetic diversity of *B. anthracis* as shown by MLVA genotyping. Strains of two main phylogenetic lineages: A and B (B2) were found in Poland. This is in accordance with the global phylogeographic model of *B. anthracis* distribution. Lineage A is most numerous and encompasses diverse strains world-wide, while B1, B2 and the recently established C lineage are uncommon and seem to be geographically limited to South Africa, Europe and USA, respectively. *B. anthracis* is highly monomorphic within a single epidemic cycle and is capable to occupy the same territory for decades, where it remains apparently unaltered. Anthrax agent has followed ancient tribes in their route from Africa to Europe, Asia and *via* Silk Road to China, then to North America. More recently anthrax emerged in Australia and in Texas, USA, where it was most probably brought by first settlers from England and China, respectively.

1. Introduction – anthrax past: and present. 2. Anthrax: infection-cycle, clinical manifestations, treatment and prevention. 2.1. Occurrence of anthrax – history and today. 2.2. *B. anthracis* – warfare and terrorist agent. 3. Biological features and virulence factors of the anthrax agent. 3.1. *Bacillus cereus* ssp. *anthracis*? 4. *B. anthracis* identification and diagnostics. 5. Molecular approaches to *B. anthracis* typing – development and description. 5.1. MLVA. 5.2. SNR. 5.2. canSNPs. 6. Phylogeny and molecular epidemiology of *B. anthracis*. 6.1. Diversity of the global *B. anthracis* population. 6.2. Monomorphism of *B. anthracis* isolates in local outbreaks. 7. Molecular characterization of *B. anthracis* in Poland. 8. Concluding remarks

Słowa kluczowe: *Bacillus anthracis*, MLVA, canSNPs, SNR

Key words: *Bacillus anthracis*, MLVA, canSNPs, SNR

1. Wprowadzenie – wąglik wczoraj i dziś

Wąglik jest ostrą chorobą zakaźną zwierząt roślinożernych, które pośrednio stanowią główne źródło zakażeń ludzi i zwierząt drapieżnych [8]. Zapisy historyczne wskazują, że zoonoza ta trapiła ludzkość już za czasów Homera. Jej etiologiczny czynnik – laseczkę wąglika (*Bacillus anthracis*) – odkryto w pierwszej połowie XIX w. W tym czasie choroba dziesiątkowała bydło i owce w Europie [43]. Jej ofiarami stawali się często ludzie, którzy zajmowali się zakażonymi zwierzętami lub trudnili się obróbką produktów pochodzenia zwierzęcego. Wysoką śmiertelność na wąglik odnotowywano przeważnie wśród osób zajmujących się przeladunkiem skór i sierści zwierząt. W Polsce, jeszcze w latach międzywojennych wąglik stanowił plagę. Epidemie tej choroby zdarzały się corocznie jeszcze w latach 1950–1960 [28]. Natomiast w kolejnym dwudziestolecu liczba zachorowań uległa tak znacznemu

ograniczeniu, że od początku lat 90. przypadki tej choroby odnotowywane były jedynie sporadycznie.

Obecnie w Europie naturalne epidemie wąglika wśród zwierząt zdarzają się w południowych Włoszech [9]. Choroba ta wciąż występuje endemicznie w azjatyckiej części Turcji [16], w Pakistanie i sąsiadujących prowincjach Indii [37], a także w Chinach [39], w Afryce, w niektórych stanach USA [39] i Ameryce Południowej.

W przeciwieństwie do początkowego okresu XX wieku, obecnie wąglik jako odzwierzęca choroba ludzi występuje na tyle rzadko, że lekarze klinicyści mają trudności z jej szybkim i jednoznacznym rozpoznaniem. Taka sytuacja zaistniała w 2001 roku w USA, gdzie doszło do epidemii tej choroby u ludzi [14]. Przyczyną zakażeń były przesyłki pocztowe celowo skażone przetrwalnikami *B. anthracis* i rozesłane w ramach działań o charakterze terrorystycznym. Od tego czasu, wąglik postrzegany jest przez opinię

publiczną i ekspertów jako choroba, która może zagrozić społeczeństwu na masową skalę w wyniku aktu terrorystycznego [4]. Z tego względu, w ostatnich latach szczególną wagę przywiązywano do badań mających na celu rozwój metod umożliwiających szybką identyfikację laseczki węgliką oraz pozwalających na efektywne różnicowanie szczepów tego drobnoustroju, celem zwiększenia skuteczności dochodzenia epidemiologicznego ognisk węgliką. Pośrednio, działania te przyczyniły się też do znacznego wzrostu wiedzy w zakresie biologii, molekularnej epidemiologii i filogenetyki *B. anthracis*.

2. Wąglik: rezerwuuar, objawy, leczenie i zapobieganie

Naturalnym rezerwuarem laseczki węgliką jest gleba skażona przetrwalnikami *B. anthracis*. Przetrwalniki, zwane potocznie sporami, są odporne na skrajne warunki środowiska, podstawowe środki higieniczne i dezynfekcyjne, a ponadto mogą przez dziesięciolecia zachowywać zdolność wywoływania zakażeń. W okresie ulewnych deszczy przetrwalniki laseczki węgliką są wymywane z gleby i zostają przenoszone przez wodę do zagłębień terenu, gdzie po opadnięciu wody osadzają się na powierzchni roślin znajdujących się na ich dnie [8]. Następnie, wraz z roślinnością, przetrwalniki są zjadane, a także wdychane przez żerujące zwierzęta roślinożerne, u których dochodzi do „kiełkowania” przetrwalników (germinacja) i rozwinięcia się form wegetatywnych – Gram-dodatnich laseczek węgliką. Formy wegetatywne dzięki wytwarzaniu specyficznej toksyny i obfitej otoczki szybko mnożą się w organizmie zwierzęcia, licznie występują we krwi oraz w innych płynach ustrojowych i w okresie 2–4 dni powodują toksemie i śmierć zwierzęcia. Zgon poprzedzony jest z reguły silnymi zaburzeniami neurologicznymi, które zwiększają podatność zwierzęcia na atak drapieżników, czy też w przypadku zwierząt hodowlanych, wpływają na podjęcie decyzji o ich uboju.

Laseczki węgliką znajdujące się w płynach ustrojowych bardzo szybko wytwarzają przetrwalniki, które wraz z płynami fizjologicznymi wyciekają ze zwłok do gruntu lub zakażają zwierzęta drapieżne albo ludzi zajmujących się obróbką skór, sierści i kości zwierząt zakażonych tym drobnoustrojem [42].

W zależności od wrót zakażenia u ludzi wyróżnia się trzy podstawowe kliniczne postaci węgliką: skórną, płucną i żołądkowo-jelitową [15].

Postać skórną, do której dochodzi poprzez przeniknięcie przetrwalników węgliką przez skórę w miejscach zranień, jest najczęściej obserwowana u osób mających kontakt z chorymi zwierzętami lub trudniących się tradycyjną uprawą ziemi na obszarach skażonych przetrwalnikami. W miejscu wnikięcia przetrwalników,

na skórze pojawia się charakterystyczna czarna krostka ze strupem otoczonym pęcherzykami [15]. Postać skórną, zwłaszcza zlokalizowaną z dala od głowy (dłonie, stopy) często ulega samowyleczeniu w ciągu kilku tygodni. Przy innym umiejscowieniu zmian, może dojść do przedostania się laseczek węgliką do krwiobiegu i wstępującej posocznicy, która od trzeciej doby po wystąpieniu pierwszych objawów jest z reguły śmiertelna, nawet gdy stosuje się właściwą antybiotykoterapię [42].

Postać płucną węgliką rozwija się u osób, które przebywały w pomieszczeniach, w których rozpylone były przetrwalniki *B. anthracis*. W XIX wieku, ta postać choroby występowała u dokerów w Anglii, którzy zajmowali się przeładunkiem importowanych skór, sierści i runa owczego. Aktualnie na wystąpienie postaci płucnej narażone mogą być głównie ofiary ataku bio-terrorystycznego. Przyjmuje się, że do efektywnego zakażenia człowieka wystarcza dawka 8–10 tys. przetrwalników [15]. Zakażenie objawia się jako ostre, przypominające grype, zapalenie dróg oddechowych, które po 2–4 dniach przechodzi w ciężką niewydolność oddechową z towarzyszącą posocnicą. Z reguły chorzy, u których pojawiły się takie objawy umierają w ciągu kolejnych 36–48 godzin nawet, gdy są poddawani właściwej antybiotykoterapii i leczeniu objawowemu [15].

Postać żołądkowo-jelitową występuje u osób które spożyły mięso zwierzęcia chorego na wąglik, a w szczególności, gdy nie zostało ono poddane długotrwałej obróbce termicznej. Objawy zakażenia są nietypowe (nudności, bóle brzucha, gorączka i krwawa biegunka). U 25–60% osób zakażonych dochodzi do toksemii, sinicy i zgonu w okresie od 2 do 5 dni od wystąpienia objawów. Podobnie jak przy postaci płucnej szanse na wyleczenie są nikłe.

Leczenie polega na jak najwcześniejszym podaniu antybiotyku i ewentualnym leczeniu objawowym. Większość dzikich szczepów laseczki węgliką jest wrażliwa na penicylinę, doksycylinę, makrolidy i ciprofloksacynę [15]. U osób, u których podejrzewana jest inhalacja przetrwalników *B. anthracis* wskazane jest stosowanie antybiotykoterapii prewencyjnej przez 6 dni, a niekiedy także przez okres do 40 dni. Szczepienia dają późną i krótkotrwałą odporność. Przeznaczone są dla osób z grup ryzyka.

Zapobieganie szerzeniu się węgliką u zwierząt hodowlanych polega na odizolowaniu i sanitarnym uboju osobników zakażonych lub podejrzanych o zakażenie oraz właściwej utylizacji zwłok – spalanie lub ostatecznie umieszczenie zwłok w głębokim wykopie [15]. Do niedawna zalecano też posypywanie zwłok wapnem chlorowanym, lecz ostatnie doniesienia wskazują, że zabieg ten może być niewskazany [3]. Pomocne bywa też stosowanie szczepień zapobiegawczych u zwierząt

na terenach przyległych do miejsca wystąpienia zachorowań [15], gdyż istnieje możliwość roznoszenia choroby przez owady gryzące [8].

2.1. Wąglik – występowanie dawniej i obecnie

Zdaniem części autorów, piąta i szósta plaga egipska opisana w Biblii może prawdopodobnie stanowić jeden z najstarszych zapisów świadczących o występowaniu wąglika. Wiernie przypominające wągliki opisy objawów chorobowych u ludzi i zwierząt można znaleźć już w zapiskach antycznych [43]. Wyniki analizy tych zapisów sugerują, że wągliki towarzyszył człowiekowi już w czasach bitwy o Troję. Na przestrzeni wieków wągliki opisywany był wielokrotnie, także w pismach Hipokratesa, Galena i autorów z X wieku. We Francji, Włoszech, Anglii, Polsce i Węgrzech wągliki pojawiał się często w tekstach różnych autorów z okresu XVI–XVIII w [43]. W kolejnym stuleciu, choroba ta stanowiła istotny problem zdrowotny ludzi i była poważną przyczyną strat w hodowli zwierząt.

Zapisy historyczne i dane epidemiologiczne wskazują, że wągliki w Polsce występowały od dawna i stanowił poważny problem. Dane z lat 1923–1927 pokazują, że w tym okresie chorobę rozpoznano u 19 tys. zwierząt w 4,5 tys. gospodarstwach w Polsce [28]. Rocznie zakażeniu ulegało w tym czasie około 60 osób. W latach 1951–1961 liczba zachorowań u ludzi w kraju spadła do około 10 przypadków rocznie, podczas gdy na półwyspie Iberyjskim i Apenińskim oraz na Bałkanach zachorowania stwierdzano u setek osób [28].

W czasach obecnych zachorowania ludzi na wągliki w Polsce praktycznie nie występują. Odnotowywane są one natomiast w Azji Mniejszej i przylegającej części Indii [37]. Na początku 2010 r. pojawiły się alarmujące doniesienia o przypadkach tej choroby w Szkocji [36] i w Niemczech [35]. Łącznie zakażenie laseczką wąglika potwierdzono u 15 osób, z których 8 zmarło. Źródłem zakażenia była prawdopodobnie heroina zanieczyszczona przetrwalnikami *B. anthracis*, którą narkomani podawali sobie dożylnie.

W USA stwierdzano też przypadki zakażeń laseczką wąglika u rzemieślników wytwarzających ludowe instrumenty muzyczne, głównie bębny. Instrumenty te były wytwarzane z zachowaniem tradycyjnej afrykańskiej technologii i naturalnych materiałów. Przypadki wąglika odnotowywano też sporadycznie u osób wykorzystujących tego typu instrumenty.

W od wielu lat ogniska wąglika u zwierząt zdarzały się w USA, głównie w stanach Nebraska, Iowa i w obu stanach Dakota oraz w okolicach stanu Teksas [39]. W Europie zachorowania odnotowywano we Włoszech i Francji [9]. W Australii, gdzie chorobę tę uznano za opanowaną, na przełomie lat 2007 i 2008

w rejonie miejscowości Hunter Valley nieoczekiwanie pojawiło się duże ognisko wąglika u bydła [7]. Uznano, że zwierzęta zakażyły się przetrwalnikami pozostałymi po ubiegłych epidemiach, z których ostatnia miała miejsce w 1939 r. Przetrwalniki te zostały wymyte z gleby przez ulewne deszcze, które padały w połowie i pod koniec 2007 r. Według ostatnich danych prasowych, podobna sytuacja miała również niedawno miejsce w Słowacji. Natomiast u dzikich zwierząt epidemie wąglika odnotowywane są regularnie w parkach narodowych w USA i Kanadzie [29], we Włoszech [8] i w RPA [40].

2.2. Wągliki jako broń biologiczna i czynnik terroryzmu

W okresie I wojny światowej podjęto pierwsze próby wykorzystania wąglika jako broni biologicznej. W trakcie II wojny światowej zainteresowanie militarnym wykorzystaniem laseczki wąglika znacznie wzrosło w Wielkiej Brytanii i USA [43]. W kolejnych latach działania te rozwijał ZSRR, aż do poważnego wypadku w Swierdłowsku, gdzie w 1979 roku w wyniku awarii zachorowało i zmarło kilkadziesiąt osób [31].

W czerwcu 1993 roku terroryści z japońskiej sekty Aum Shinrikyo po raz pierwszy wykorzystali hodowlę laseczek wąglika przeciwko mieszkańcom miasta Kameido [18]. Szczęśliwie, aparat rozpylający zawiesinę bakteryjną został szybko wykryty, a szczep którym posłużyli się terroryści był szczepem szczepionkowym, o obniżonej zjadliwości, dzięki czemu atak ten nie spowodował ofiar. Kolejny atak bio-terrorystyczny miał miejsce w USA w 2001 roku. Łącznie zakażeniu uległy tam 22 osoby, z czego 5 zmarło [14].

3. Charakterystyka i czynniki chorobotwórczości laseczki wąglika

Formy wegetatywne *B. anthracis* są Gram-dodatnimi laseczkami tworzącymi charakterystyczne kolonie na pożywce z dodatkiem krwi baraniej, które kształtem przypominają głowę meduzy. Większość dzikich szczepów nie wykazuje zdolności do ruchu i hemolizy, choć znane są wyjątki [42]. Chorobotwórczość laseczki wąglika związana jest głównie z dwoma czynnikami: toksyną i otoczką.

W 1961 roku wykazano, że toksyna wąglika składa się z trzech komponentów: czynnika obrzęku (Edema factor) czynnika letalnego (Lethal factor) oraz antygeny ochronnego (Protective antigen), a w latach 1980–1989 poznano sekwencje aminokwasowe tych podjednostek i opracowano model działania toksyny [25]. Wykazano, że podjednostki toksyny kodowane są przez

geny: *pagA*, *lef* i *cya* zlokalizowane w plazmidzie pX01 (181,6 kpz). Geny te znajdują się w obrębie wyspy patogenności o wielkości 44,8 kb, która obejmuje również geny regulatorowe, kontrolujące wytwarzanie toksyny. Wyspa ta zawiera także geny odpowiedzialne za proces kiełkowania przetrwalników, zgrupowane w operon *gerX* [30].

Otoczkę, będącą drugim istotnym czynnikiem chorobotwórczości *B. anthracis*, opisano w 1903 roku. W latach 1933–1937 udało się ją oczyścić i wykazać, że zbudowana jest z polimeru kwasu D-glutaminowego [27]. Prawie pięćdziesiąt lat później stwierdzono, że wytwarzanie otoczki warunkują geny *capA*, *capB* i *capC*, zlokalizowane w plazmidzie pX02 (96,2 kpz). Geny te wraz z genem *dep* związanym z depolimeryzacją otoczki, tworzą w plazmidzie pX02 wyspę patogenności [27, 33]. Późniejsze badania przyczyniły się do identyfikacji czynników inicjujących wytwarzanie toksyny i otoczki oraz lepszego poznania mechanizmów regulujących procesy wytwarzania i kiełkowania przetrwalników *B. anthracis*.

Analiza porównawcza kompletnych genomów różnych szczepów *B. anthracis* wykazała, że drobnoustroje należące do tego gatunku charakteryzują się niezmiernie wysokim podobieństwem sekwencji nukleotydów oraz niemal bez wyjątku, posiadają identyczną organizację genomu [20]. Warto zauważyć, że blisko 37% szczepów *B. anthracis* znajdujących się obecnie w kolekcjach laboratoryjnych na świecie wykazuje zróżnicowanie nie przekraczające 100 pojedynczych mutacji punktowych (SNPs) [21].

3.1. *Bacillus cereus* ssp. *anthracis*?

Badania molekularne przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu pokazały, że *B. anthracis* jest blisko spokrewniony z kilkoma innymi gatunkami laseczek z rodzaju *Bacillus*, określanymi mianem „grupy *Bacillus cereus*” [20]. Uważa się, że laseczka wąglika mogła wyewoluować z gatunku *B. cereus* (*sensu stricto*) lub *B. thuringiensis*, w wyniku pozyskania plazmidów pX01 i pX02, które umożliwiły temu drobnoustrojowi skuteczne namnażanie się w organizmie zwierząt roślinożernych. Co więcej, stale rośnie liczba danych piśmiennictwa, które wskazują, że proces przechwytywania plazmidów, wykazujących znaczą homologie do pX01 i pX02, przez różne szczepy *B. cereus* i *B. thuringiensis* wciąż zachodzi w środowisku [24]. Podobieństwo „genetycznego szkieletu” laseczki wąglika i innych przedstawicieli grupy *B. cereus*, a także fakt, że część szczepów z tej grupy może posiadać plazmidy przypominające pX01 i pX02 znacząco utrudnia molekularną identyfikację laseczki wąglika, zwłaszcza w próbkach materiału ze środowiska [6, 24].

4. Identyfikacja laseczki wąglika

Początkowo identyfikacja *B. anthracis* ograniczała się do prób biologicznych na zwierzętach. W 1903 roku McFadyean opracował metodę barwienia błękitem metylenowym pozwalającą obserwować otoczkę *B. anthracis*. Od 1966 r. zastosowanie w izolacji i identyfikacji laseczki wąglika znalazło selektywne podłoże PLET (polimyksyna-lizozym-EDTA-octan talawy) opisane przez Knisleya [23]. W nielicznych laboratoriach do identyfikacji *B. anthracis* wykorzystywany jest też specyficzny bakteriofag gamma, wyosobniony w 1955 r. przez Brown i Cherry [2].

Natomiast testami PCR poszukuje się przeważnie plazmidowych genów związanych z wytwarzaniem toksyny wąglika lub otoczki, co wystarcza do identyfikacji dzikich szczepów *B. anthracis* lecz jest mało przydatne dla wykrywania szczepów, które utraciły jeden lub dwa plazmidy. Co więcej, testy te mogą dawać wyniki wątpliwe lub nawet fałszywie dodatnie, gdy w badanym materiale znajdować się będą laseczki z grupy *B. cereus* posiadające plazmidy homologiczne do pX01 i pX02 [32, 33]. Chociaż, sytuacja taka zdarza się w diagnostyce wąglika rzadko, to może ona stanowić istotny problem w badaniach próbek materiału środowiskowego na obecność laseczki wąglika [6]. Dlatego, dla potrzeb identyfikacji *B. anthracis* opracowano szereg chromosomalnych markerów, w tym: BA813, SG749 [5], *rpoB* [45], z których najbardziej swoisty jest regulatorowy gen *plcR* [19]. Gen ten zawiera pojedynczą mutację punktową typu non-sens, która powoduje, że jego produkt ulega skróceniu u *B. anthracis* podczas, gdy u innych szczepów z grupy *B. cereus* jest on wytwarzany w normalnej długości. Uważa się, że zmiana wielkości białka regulatorowego PlcR wpływa na szereg funkcji w komórce, odróżniając laseczkę wąglika od innych laseczek z grupy *B. cereus* [1]. Co ważne, obecność tej mutacji w *plcR* można wykryć przy już użyciu podstawowych technik molekularnych [11].

5. Rozwój metod typowania szczepów laseczki wąglika

Badania prowadzone w latach 1990–2000 pokazały, że szczepy *B. anthracis* charakteryzują się znikomym zróżnicowaniem genetycznym. Zauważono, że techniki przydatne do genotypowania innych bakterii, w tym PFGE (makrorestrykcyjna analiza chromosomalnego DNA i elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym), są bezużyteczne przy próbach typowania szczepów laseczki wąglika. Dopiero zastosowanie metody AFLP (polimorfizm amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych) pozwoliło dokonać pierwszej udanej próby różnicowania szczepów laseczki wąglika, co

przyczyniło się do odkrycia dwóch głównych linii filogenetycznych *B. anthracis* [13]. Opracowanie bardziej wydajnych metod różnicowania szczepów laseczki wąglika stało się możliwe dopiero po poznaniu sekwencji nukleotydowej genomu *B. anthracis* [38]. Wyśiłki w tym zakresie zostały zintensyfikowane po wydarzeniach z 2001 r. w USA tak, że do chwili obecnej poznane zostały genomy pięciu szczepów *B. anthracis*. Porównawcza analiza genomów różnych szczepów laseczki wąglika potwierdziła wyjątkową genetyczną jednorodność tego drobnoustroju [44].

5.1. MLVA

Dochodzenie epidemiologiczne ognisk wąglika niezmiernie ułatwiła nowa metoda genotypowania *B. anthracis*, wykorzystująca polimorfizm tandemowych sekwencji powtórzonych: variable-number tandem-repeats (VNTR) [17]. Sekwencje te charakteryzuje tak wysoka zmienność, że uznawane są one za najbardziej polimorficzne odcinki genomu bakteryjnego. Metoda ta, zwana multiple-locus VNTR-analysis (MLVA), została opracowana w 2000 roku. Dzięki wykorzystaniu ośmiu wysoce polimorficznych markerów VNTR (*vrrA*, *vrkB*₁, *vrkB*₂, *vrnC*₁, *vrnC*₂, CG3, pXO1-*aat*, pXO2-*at*) po raz pierwszy osiągnięto wysoki potencjał dyskryminacyjny w różnicowaniu szczepów *B. anthracis*. Wyróżniono 89 genotypów wśród 426 szczepów laseczki wąglika, co pokazało, że MLVA jest skuteczną metodą genotypowania *B. anthracis*.

Aby zapewnić wyższy potencjał różnicujący metody MLVA, w kolejnych latach zwiększono liczbę markerów VNTR do 15 [44], a nawet do 25 [26], uzyskując szczegółowy wgląd w globalną i lokalną strukturę populacji *B. anthracis*. Metoda ta umożliwiła przygotowanie dokładnych modeli filogenetycznych *B. anthracis* [17, 39, 44].

5.2. SNR

W 2006 roku opracowano nową metodę subtypowania *B. anthracis*, która pozwalała na różnicowanie szczepów należących do tego samego genotypu MLVA [41]. Metoda ta przypomina swoimi założeniami MLVA lecz przedmiot analizy stanowi 21 markerów (loci) zawierających powtórzenia jednonukleotydowe (Single Nucleotide Repeats). Metoda SNR wymaga stosowania technik gwarantujących odróżnianie odcinków DNA różniących się tylko pojedynczym nukleotydem. Ze względu na dużą pracochłonność tego typu analiz, inni autorzy wykorzystywali w swoich badaniach jedynie cztery markery wykazujące największy potencjał różnicujący [22]. Metoda SNR okazała się przydatna w epidemiologicznym dochodzeniu lokalnych ognisk wąglika u dzikich zwierząt [9].

5.2. canSNPs

Porównawcza analiza genomów różnych szczepów laseczki wąglika umożliwiła opracowanie kolejnej metody różnicowania *B. anthracis* [44]. Metoda ta wykorzystuje 14 specyficznych *loci* zawierających punktowe mutacje reprezentatywne dla 12 linii filogenetycznych *B. anthracis* [34, 39]. Mutacje te, a właściwie polimorficzne nukleotydy, nazywane są polimorfizmami kanonicznymi (canSNP), gdyż pozwalają zidentyfikować poszczególne linie filogenetyczne *B. anthracis* bez konieczności każdorazowego badania kilkuset nukleotydów polimorficznych rozproszonych w całym genomie [34]. Ta nowa metoda typowania jest często stosowana w połączeniu z MLVA [44, 39] i może być szczególnie przydatna w charakteryzowaniu szczepów wyosobnionych w trakcie dochodzeń epidemiologicznych ognisk wąglika i w rekonstrukcjach filogenetycznych [44, 39, 31].

6. Filogeneza i molekularna epidemiologia laseczki wąglika

Wyniki badań szczepów pochodzących z wielu krajów (USA, Francja, Polska, Włochy, RPA, Kanada, Rosja, Chiny) pokazują, że wąglik jest zoonozą wywodzącą się z południa Afryki, która rozprzestrzeniła się globalnie wraz z wędrownymi plemionami pasterskimi [44]. Choroba dotarła do Europy, Azji i jedwabnym szlakiem do Chin [39]. W 1847 roku wąglik został zawleczony przez osadników do Australii. Podobnie, w początku XIX wieku wąglik dotarł do południowych rejonów Ameryki Północnej [39]. Natomiast do północnej części tego kontynentu choroba mogła zostać zawleczona już przez pierwotne plemiona wędrownie, które kilka tysięcy lat temu przebyły Cieśninę Beringa [39].

Wyniki przeprowadzonego niedawno genotypowania szczepów *B. anthracis* wyizolowanych w Chinach wskazują, że występujący na południu USA szczep Ames wywodzi się najprawdopodobniej z Chin, a nie z Europy czy też z Ameryki Północnej [39].

6.1. Zróżnicowanie szczepów *B. anthracis* w skali globalnej

Połączenie MLVA i can-SNP pozwoliło uzyskać szczegółowy wgląd w przebieg i dynamikę lokalnych epidemii wąglika, a także umożliwiło stworzenie ujednoliczonego, modelu filogenetyczno-geograficznego *B. anthracis* w skali globalnej [44, 39].

Obecnie wiadomo, że gatunek *B. anthracis* obejmuje dwie główne linie filogenetyczne: A i B, z których linia A grupuje liczne i wyraźnie zróżnicowane szczepy występujące obecnie na wszystkich zamieszkałych

przez człowieka kontynentach, zaś linia B ogranicza się do szczepów występujących w południowej części Afryki (B1), których część również trafiła do Europy (linia B2), gdzie utrzymują się od lat w swojej niszy ekologicznej [10, 21]. Szczepy z grupy B2 wykrywano we Francji, w Polsce i na Bałkanach [10]. Ponadto w Ameryce Północnej znaleziono też nieliczne szczepy, które reprezentują odrębną linię filogenetyczną – C. Część autorów uważa, że linia C obejmuje filogenetycznie najstarsze szczepy *B. anthracis* [34]. Szczepy linii C wykryto w trakcie szeroko zakrojonych badań, które nie były jak dotąd prowadzone na taką skalę poza USA, z tego względu nie można jednoznacznie wykluczyć występowania szczepów linii C także na innych kontynentach.

Szczepy *B. anthracis* z linii A reprezentują dwa duże rejonu geograficzne: zachodnią Amerykę Północną (WNA) i Eurazję (TEA), które łącznie obejmują około 37% populacji. Ponadto można tu wyróżnić też dwie kolejne grupy szczepów: Vollum (5%) i Ames (1%).

Wśród szczepów z linii B dominuje afrykańska podgrupa B1 – do niedawna uważana za najbardziej pierwotną populację laseczki wąglika – obejmująca około 6%, a także mniej liczna afro-europejska grupa B1 (1%). Szczepy linii C obejmują zaledwie 0,2% populacji.

Na obszarze obu Ameryk dominują liczebnie klonny *B. anthracis* z linii A reprezentujące jednakowy lub zbliżony typ MLVA i canSNP, co może być następstwem względnie niedawnego zawleczenia choroby i szybkiego szerzeniem się jej czynnika etiologicznego, czemu sprzyjać może intensywna hodowla bydła w formie dużych stad. Porównywalny stopień klonalności obserwowano też wśród szczepów *B. anthracis* wyizolowanych w Australii [44], gdzie wąglik zawleczono zaledwie 160 lat temu.

6.2. Zróżnicowanie izolatów *B. anthracis* w epidemiach lokalnych

Badania prowadzone w Parku Narodowym Pollino, Basilicata w południowych Włoszech, gdzie od lat okresowo zdarzają się naturalne epidemie wąglika wśród dziko-żyjących zwierząt roślinożernych pozwoliły śledzić cykle epidemiczne wąglika i wykazały jedynie śladowy zakres molekularnego zróżnicowania poszczególnych izolatów *B. anthracis* wyosabnionych od kolejnych zwierząt, które padły na wąglik w trakcie szerzenia się epidemii tej choroby [9]. Wyniki tych badań pokazały, że z jednym wyjątkiem, zachorowania w 41 ogniskach, do których doszło w trakcie epidemii, spowodowane były tym samym szczepem *B. anthracis*. Szczep ten występował na terenie parku od lat. Podobnych informacji dostarczyły też wyniki analogicznych badań przeprowadzonych w Kanadzie [29].

7. Charakterystyka molekularna szczepów laseczki wąglika w Polsce

Przeprowadzone metodą MLVA retrospektywne badania szczepów *B. anthracis* wyizolowanych w Polsce [10, 12] wykazały wysoki, w porównaniu do innych krajów europejskich, stopień zróżnicowania szczepów laseczki wąglika w kraju. Dostępne dane piśmiennictwa wskazują, że na terenie Polski występowały szczepy *B. anthracis* należące przynajmniej do 7 różnych genotypów MLVA, które reprezentowały dwie główne linie filogenetyczne A i B (B2). Tak znaczne zróżnicowanie populacji *B. anthracis* w Polsce może być następstwem efektywnej, lokalnej ewolucji szczepów tego drobnoustroju, która zachodziła przez kolejne stulecia, podczas rokrocznych epidemii wąglika. Ponadto, szczepy z różnych rejonów Europy i Azji Mniejszej mogły być na przestrzeni stuleci sprowadzane na teren Polski wraz z migrującymi stadami bydła, owiec i koni, w następstwie licznych działań wojennych bądź wymiany handlowej.

8. Podsumowanie

Wąglik, jako choroba zwierząt i ludzi została w Polsce i w Europie niemal całkowicie wyeliminowana, choć są regiony gdzie wciąż występuje ona endemicznie. Należy też pamiętać, że przetrwalniki *B. anthracis* zachowują żywotność przez wiele dziesięcioleci i przy korzystnych warunkach pogodowych (ulewne deszcze, powódzie) mogą zostać wyplukane z gleby i wywołać lokalne ogniska wśród zwierząt na terenach, na których od dziesięcioleci nie obserwowano tej choroby. Z tego względu konieczne jest podtrzymywanie stałej zdolności do szybkiej identyfikacji i typowania tego drobnoustroju w kraju, co ze względów ekonomicznych powinno być w gestii stałego, referencyjnego laboratorium.

Badania przeprowadzone w ostatniej dekadzie pozwoliły poznać filogenezę i molekularną epidemiologię laseczki wąglika, czyli dostrzec zależności pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym szczepów *B. anthracis*, a ich geograficznym występowaniem, sposobem szerzenia się w trakcie epidemii, rezerwuarem i historycznym pochodzeniem. Drobnoustrój ten od wieków towarzyszył ludzkości i wraz z jej ekspansją wkraczał na nowe tereny i zajmował nowe nisze ekologiczne [21], w których pozostanie jeszcze przez wiele pokoleń.

Piśmiennictwo

1. Agaisse H., Gominet M., Økstad O.A., Kolstø A.B., Lereclus D.: PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **32**, 1043–1053 (1999)

2. Brown E.R., Cherry W.B.: Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J. Infect. Dis.* **96**, 34–39 (1955)
3. Chelsea G. Himsworth. The danger of lime use in agricultural anthrax disinfection procedures: the potential role of calcium in the preservation of anthrax spores. *Can. Vet. J.* **49**, 1208–1210 (2008)
4. Chomiczewski K., Kocik J., Szkoda M.T.: Bioterroryzm. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
5. Daffonchio D., Borin S., Frova G., Gallo R., Mori E., Fani R., Sorlini C.: A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1298–1303 (1999)
6. Daffonchio D., N. Raddadi i wsp.: A strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1295–1301 (2006)
7. Durrheim D.N., Freeman P., Roth I., Hornitzky M.: Epidemiologic questions from anthrax outbreak, Hunter Valley, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 840–842 (2009)
8. Fasanella A., Galante D., Garofolo G., Jones M.H.: Anthrax undervalued zoonosis. *Vet. Microbiol.* **140**, 318–331 (2010)
9. Garofolo G., Ciammaruconi A., Fasanella A., Scasciamacchia S., Adone R., Pittiglio V., Lista F.: SNR analysis: molecular investigation of an anthrax epidemic. *BMC Vet. Res.* **28**, 6–11 (2010)
10. Gierczyński R., Kałużewski S., Rakin A., Jagielski M., Zasada A., Jakubczak A., Borkowska-Opacka B., Rastawicki W.: Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland – the molecular echoes of the past outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.* **239**, 235–240 (2004)
11. Gierczyński R., Zasada A.A., Raddadi N., Merabishvili M., Daffonchio D., Rastawicki W., Jagielski M.: Specific *Bacillus anthracis* identification by a *plcR*-targeted restriction site insertion-PCR (RSI-PCR) assay. *FEMS Microbiol. Letters*, **272**, 55–59 (2007)
12. Gierczyński R., Jakubczak A., Jagielski M.: Extended multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Bacillus anthracis* strains isolated in Poland. *Pol. J. Microbiol.* **58**, 3–7 (2009)
13. Jackson P.J., Hill K.K., Laker M.T., Ticknor L.O., Keim P.: Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 263–269 (1999)
14. Jernigan D.B., P. L. Raghunathan i wsp.: Investigation of bio-terrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1019–1028 (2002)
15. Kałużewski S.: Wąglik (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. wyd. IV red. Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A. Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała 2007, str. 317–322
16. Karahocagil M.K., Akdeniz N., Akdeniz H., Calka O., Karsen H., Bilici A., Bilgili S.G., Evirgen O.: Cutaneous anthrax in Eastern Turkey: a review of 85 cases. *Clin. Exp. Dermatol.* **33**, 406–411(2008)
17. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K. L., Schupp J. M., Okinaka R., Jackson P. J., Hugh-Jones M. E.: Multiple-locus variable-number tandem repeats analysis reveals genetic relationship within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **182**, 2928–2936 (2000)
18. Keim P., K.L. Smith i wsp.: Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4566–4567 (2001)
19. Keim P.: Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1995–1997 (2005)
20. Keim P., Gruendike J.M., Klevytska A.M., Schupp J.M., Challacombe J., Okinaka R.: The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects. Med.* **30**, 397–405 (2009).
21. Keim P.S., Wagner D.M.: Humans, evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 813–821 (2009)
22. Kenefic L.J., Trim C., Huynh L., Zanecki S., Matthews M., Schupp J., Van Ert M., Keim P.: A high resolution four-locus multiplex single nucleotide repeat (SNR) genotyping system in *Bacillus anthracis*. *J. Microbiol. Methods*, **73**, 269–272 (2008)
23. Knisley R.F.: Selective medium for *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **92**, 784–286 (1966)
24. Kolstø A.B., Tourasse N.J., Økstad O.A.: What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 451–476 (2009)
25. Lacy D.B., Collier R.J.: Structure and function of anthrax toxin (w) w: Anthrax (red.) Koehler T.M. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2002
26. Lista F., Faggioni G. i wsp.: Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiology*, **6**, 33 (2006).
27. Makino S.I., Uchida I., Terakado N., Sasakawa C., Yoshikawa M.: Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **171**, 722–730 (1989)
28. Naruszewicz-Lesiuk D.: Wąglik (w) Choroby zakaźne w Polsce i ich zwalczanie w latach 1919–1962, red. Kostrzewski J., PZWL, Warszawa, 1964
29. Nishi J.S., Ellsworth T.R., Lee N., Dewar D., Elkin B.T., Dragon D.C.: Northwest Territories. An outbreak of anthrax (*Bacillus anthracis*) in free-roaming bison in the Northwest Territories, June–July 2006. *Can. Vet. J.* **48**, 37–38 (2007)
30. Okinaka R.T., Cloud K. i wsp.: Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J. Bacteriol.* **181**, 6509–6515 (1999)
31. Okinaka R.T., Henrie M. i wsp.: Single nucleotide polymorphism typing of *Bacillus anthracis* from Sverdlovsk tissue. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 653–656 (2008)
32. Pannucci J., Okinaka R.T., Sabin R., Kuske C.R.: *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J. Bacteriol.* **184**, 134–141 (2002)
33. Pannucci J., Okinaka R.T., Williams E., Sabin R., Ticknor L.O., Kuske C.R.: DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics*; <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/3/34> (2002)
34. Pearson T., J.D. Busch i wsp.: Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13536–13541 (2004)
35. Radun D., Bernard H. i wsp.: Preliminary case report of fatal anthrax in an injecting drug user in North-Rhine-Westphalia, Germany, December 2009. *Euro. Surveill.* **14**, 15(2). pii: 19464 (2010)
36. Ramsay C.N, Stirling A. i wsp.: An outbreak of infection with *Bacillus anthracis* in injecting drug users in Scotland. *Euro. Surveill.* **14**, 15(2), pii: 19465 (2010)

37. Ray T.K., Hutin Y.J., Murhekar M.V.: Cutaneous anthrax, West Bengal, India, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 497–499 (2009)
38. Read T.D., Peterson S.N. i wsp.: The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, **423**, 81–86 (2003)
39. Simonson T.S., Okinaka R.T. i wsp.: *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages. *BMC Microbiol.* Apr **15**, 9–71 (2009)
40. Smith K.L., DeVos V., Bryden H., Price L.B., Hugh-Jones M.E., Keim P.: *Bacillus anthracis* diversity in Kruger National Park. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3780–3784 (2000)
41. Stratilo C.W., Lewis C.T., Bryden L., Mulvey M.R., Bader D.: Single-nucleotide repeat analysis for subtyping *Bacillus anthracis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 777–782 (2006)
42. Turnbull, P.C.B. i wsp.: Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals. 3rd ed. WHO/EMC/ZDI./98.6.
43. Turnbull P.C.B.: Anthrax history, disease and ecology [w:] Anthrax [red.] Koehler T.M. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2002
44. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M. i wsp.: Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PloS ONE*, **2** (5), e461 (2007)
45. Zasada A.A., Gierczyński R., Raddadi N., Daffonchio D., Jagielski M.: Some *Bacillus thuringiensis* strains share *rpoB* nucleotide polymorphisms also present in *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1606–1607 (2006)

Beata Sadowska^{1*}, Barbara Różalska¹

¹Zakład Biologii Zakażeń, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii,
Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź

1. Wprowadzenie. 2. Interferencja gronkowców z mechanizmami odpornościowymi gospodarza. 3. Aktywność immunomodulacyjna gronkowców. 4. *S. aureus* jako wewnątrzkomórkowy patogen. 5. Podsumowanie

Staphylococci – what’s new about them?

Abstract: Several surface structures and secreted proteins of *Staphylococcus aureus* which take part in efficacious body colonization have been well characterized. Nevertheless, staphylococci are still very difficult to control and cause many types of both community and nosocomial infections, ranging from skin lesions to life-threatening invasive diseases. The exquisite staphylococcal adaptability to changing environmental conditions is the basis for the success of these bacteria as pathogens. Staphylococci can very quickly alter the phenotype using their gene expression regulatory systems. They can change the profile of produced virulence factors or mode of growth: bacteria from planktonic culture can rapidly adhere to various surfaces, aggregate and form very well organized, morphologically and functionally differentiated communities of microorganisms – biofilm. Staphylococcal biofilms show higher resistance to many bactericidal factors, including host innate immunity, and are responsible for usually chronic, recurrent infections, very often associated with the usage of medical biomaterials. *S. aureus* is also well adapted to intracellular survival, including immunocompetent cells i.e. professional phagocytes. Recently, it has been also confirmed that some of staphylococcal virulence factors can modulate immune response, both *in vitro* and *in vivo*, influencing host susceptibility to infection.

1. Introduction. 2. Staphylococcal interference with host immune response. 3. Immunomodulatory activity of staphylococci. 4. *S. aureus* as an intracellular pathogen. 5. Summary

Słowa kluczowe: czynniki wirulencji, gronkowce, immunomodulacja, układ odpornościowy

Key words: virulence factors, staphylococci, immunomodulation, immune system

1. Wprowadzenie

Drobnoustroje towarzyszące rodzajowi ludzkiemu od początków jego istnienia zdają się stale wyprzedzać nas „o krok”. Postępowi, który niewątpliwie został osiągnięty w eliminacji chorób zakaźnych, wtóruje pojawianie się nowych zagrożeń ze strony mikroorganizmów. Wystarczy wspomnieć zakażenia wirusem HIV, HCV, atypowymi wirusami grypy, wielolekoopornymi prątkami gruźlicy, zakażenia towarzyszące stosowaniu w praktyce medycznej biomateriałów i wiele innych. Nawet drobnoustroje, które wydają się dość dobrze scharakteryzowane, potrafią zaskakiwać nieznanymi właściwościami. Z całą pewnością można zaliczyć do tej grupy gronkowce, na czele ze *Staphylococcus aureus* – najistotniejszym z tego rodzaju gatunkiem chorobotwórczym dla człowieka i zwierząt.

Zestaw posiadanych przez *S. aureus* czynników wirulencji jest niezwykle bogaty. Obejmuje on zarówno integralne struktury komórkowe, jak również szeroką grupę czynników wydzielanych do środowiska. Wśród pierwszych warto wymienić charakterystyczne dla drobnoustrojów Gram-dodatnich: peptydoglikan (PG), kwasy teichojoyowe (TA, teichoic acids) i lipoteichojo-

we (LTA, lipoteichoic acids), a także struktury typowe dla *S. aureus*, takie jak: białko A (SpA, staphylococcal protein A), czynnik skupiania (Clf, clumping factor), białko Bap (biofilm-associated protein), białka Dlt czy występujące u wszystkich gronkowców białka z grupy MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) wiążące ECM (extracellular matrix proteins). Czynniki wirulencji gronkowców wydzielane z ich komórek obejmują między innymi: adhezynę gronkowcową PIA/PNAG (polysaccharide intercellular adhesin/polymeric N-acetyl-glucosamine), białko adhezyjne Eap, białko wiążące fibrynogen Efb (extracellular fibrinogen binding protein), inhibitor komplementu SCIN (staphylococcal complement inhibitor), białko CHIPS (chemotaxis inhibitory protein of staphylococci), koagulazę, stafylokinazę (SAK) i wiele innych enzymów. Wśród czynników zewnątrzkomórkowych na szczególne wyróżnienie zasługują toksyny, w tym: hemolizyny (α , β , γ , δ), leukocydyna Panton-Valentine (PVL), toksyny epidermolityczne, enterotoksyny, toksyna zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1) czy białka przypominające superantygenu (SSLs, staphylococcal superantigen-like protein) [4, 7, 10, 13, 15, 19, 24, 28, 35, 37, 40].

* Autor korespondencyjny: Zakład Biologii Zakażeń, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki; Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: bsad@biol.uni.lodz.pl

2. Interferencja gronkowców z mechanizmami odpornościowymi gospodarza

Wydaje się, iż wszystkie czynniki wirulencji gronkowców zostały już bardzo dobrze opisane, zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym. Tymczasem wprowadzenie nowych technik badawczych oraz szersze spojrzenie na aspekty funkcjonowania i kooperacji gronkowców (np. w złożonej strukturze biofilmu, także wielogatunkowego), rzuca na wiele z tych elementów patogenności zupełnie nowe światło.

Przykładem znanych czynników wirulencji *S. aureus* o niedawno ujawnionych nowych właściwościach może być powierzchniowe białko A. Udział SpA w hamowaniu fagocytozy i blokowaniu klasycznej drogi aktywacji dopełniacza, będący efektem nieswoistego wiązania immunoglobulin klasy IgG i IgM przez ich fragment Fc, jest znany od lat. Najnowsze badania dodatkowo wskazują na SpA, jako jeden z ważniejszych czynników promujących agregację gronkowców i tworzenie przez te drobnoustroje biofilmu. Wykazano, iż nawet sama obecność SpA w podłożu wzrostu drobnoustrojów nasila interakcje międzykomórkowe. Zaś delekcja genu *spa* ogranicza zdolność tak powstałych mutantów *S. aureus* do zasiedlania biomateriałów medycznych *in vivo* [28]. Ponadto zwraca się też uwagę na inną aktywność biologiczną SpA. Wiązanie tego białka z receptorem dla czynnika martwicy nowotworów (TNF, tumor necrosis factor) – TNFRI na komórkach eukariotycznych może prowadzić do wzbudzenia reakcji zapalnej oraz do aktywacji szlaków apoptozy [13, 28]. Tym samym ranga SpA, wśród czynników wirulencji istotnych w procesie rozwoju infekcji z udziałem gronkowców, dodatkowo wzrosła.

Niedoceniana może być także rola proteaz, jaką enzymy te odgrywają w rozwoju zakażeń z udziałem różnych mikroorganizmów, włączając w to gronkowce. Zwykle wskazuje się na znaczenie proteaz w rozprzestrzenianiu drobnoustrojów w tkankach, u podstaw którego leży ich zdolność do rozkładu białek ECM. Tymczasem proteazy należy również zaliczyć do czynników skutecznie interferujących z mechanizmami obronnymi gospodarza. Przeprowadzają one między innymi degradację defensyn i immunoglobulin [34]. Ostatnio zaś *S m a g u r* i wsp. [35] wykazali, iż proteaza SspB – jedna z czterech (obok SspA, ScpA i aureolizyny) najlepiej poznanych proteaz *S. aureus*, jest odpowiedzialna za degradację receptora FcγRIII i cząstki adhezyjnej CD11b na komórkach eukariotycznych. Aktywność tego enzymu w ustroju gospodarza utrudnia więc zjawisko chemotaksji i diapedezy leukocytów. Należy również wspomnieć o udziale proteaz drobnoustrojów w uwalnianiu ich z zewnątrzkomórkowej „sieci pułapkowej” tworzonej głównie przez granulocyty obojętnochłonne – NETs (neutro-

phil extracellular traps). Do powstawania NETs dochodzi prawdopodobnie po wyczerpaniu wszystkich możliwości wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów, kiedy aktywowane komórki wydzielają do otoczenia chromatynę i liczne peptydy bójcze (np. katepsynę G, mieloperoksydazę, elastazę, laktoferynę, żelatynazę). Tak utworzona sieć w sposób fizyczny zatrzymuje drobnoustroje w miejscu równoczesnego nagromadzenia czynników działających przeciwdrobnoustrojowo [3, 30].

Tak naprawdę jednak sukces *S. aureus* jako patogenu wynika nie tyle z aktywności biologicznej pojedynczych czynników wirulencji tego drobnoustroju, ale z umiejętności równoczesnego wykorzystania wielu z nich oraz szybkiego dostosowania ich ekspresji do konkretnie zaistniałej sytuacji *in vivo*. Synergistyczne działanie różnych wyznaczników patogenności daje gronkowcom możliwość interferencji z aktywnością układu odpornościowego gospodarza praktycznie na każdym etapie rozwoju odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowej. Zaś geny je kodujące zostały w toku ewolucji zgrupowane w większe jednostki organizacyjne genomu zwane operonami i podporządkowane systemom regulatorowym ekspresji genów (dwa najważniejsze z nich u gronkowców to *agr* – accessory gene regulator i *sarA* – staphylococcal accessory regulator A) tak, by umożliwić ich równoczesną ekspresję czy represję [6, 41].

Interferencja gronkowców widoczna jest już na pierwszym etapie rozwoju reakcji odpornościowej w organizmie gospodarza – wykazują one zdolność hamowania migracji komórek fagocytarnych do miejsca infekcji. Zjawisko diapedezy i chemotaksji leukocytów determinują swoiste receptory znajdujące się na ich powierzchni i na powierzchni innych komórek, np. śródbłonna naczyń krwionośnych. Opuszczanie krwioobiegu przez fagocyty zachodzi dzięki swoistym interakcjom typu receptor-ligand warunkowanym przez obecność na komórkach immunokompetentnych receptorów dla selektyn: PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) i ESL-1 (E-selectin ligand-1) oraz cząsteczek integryn: Mac-1, LFA-1 i VLA-4, które łączą się (odpowiednio) z selektynami P i E oraz receptorami: ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) i VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) na komórkach śródbłonna [9]. W badaniach nad patogennością gronkowców stwierdzono natomiast, iż wytwarzany przez nie polipeptyd SSL-5 wykazuje zdolność łączenia się z receptorami dla P-selektyn (PSGL-1), zaś białko Eap blokuje receptor ICAM-1 [4, 13, 18]. Tym samym oba białka produkowane przez *S. aureus* interferują z procesami przylegania fagocytów do komórek śródbłonna naczyń, toczenia się po nich i przechodzenia (diapedezy) przez ściany naczyń. Dalszy ukierunkowany ruch leukocytów w tkankach warunkują między inny-

mi czynniki chemotaktyczne powstające w organizmie gospodarza, jak uwalniane w trakcie aktywacji dopełniacza fragmenty C5a i C3a czy chemokiny (IL-8, MIP, MCP), TGF- β , leukotrien LTB₄, defensyny, czynnik aktywujący płytki (PAF) i inne. Wśród chemoatraktantów wymienia się również czynniki wydzielane przez same drobnoustroje, w tym głównie struktury zaliczane do PAMPs (patogen associated molecular patterns), jak formylowane peptydy (fMLP) [11, 32]. Odpowiedź fagocytów na czynniki chemotaktyczne następuje przy udziale swoistych dla nich receptorów na powierzchni tych komórek. Tymczasem wykazano, iż około 60% szczepów *S. aureus* produkuje białko CHIPS, które wiąże się z receptorami dla fragmentu C5a dopełniacza (C5aR) oraz z receptorami dla formylowanych peptydów (FPR) [8, 11, 32].

Po dotarciu w okolice wrót zakażenia lub innego miejsca lokalizacji drobnoustrojów patogennych, w leukocytach następuje aktywacja procesu fagocytozy i wewnątrzkomórkowego zabijania czynników zakaźnych. Gronkowce wykształciły liczne mechanizmy przeciwdziałania także tej aktywności komórek gospodarza. Do mechanizmów utrudniających fagocytozę, w tym także opsonofagocytozę (zależną od obecności opsonin, np. przeciwciał, składników komplementu) zalicza się:

- obecność na powierzchni gronkowców SpA, które jak już wspomniano nieswoiście wiąże fragment Fc przeciwciał i czynnik von Willebranda, ingeruje w pierwsze etapy klasycznej drogi aktywacji dopełniacza i uczestniczy w agregacji gronkowców;
- ekspresję białek wiążących fibrynogen: Clf i wewnątrzkomórkowego białka Efb, dodatkowo posiadającego zdolność wiązania składnika C3 dopełniacza i tym samym blokowania jego aktywacji na powierzchni gronkowców;
- produkcję białka SCIN stabilizującego kompleksy konwertazy C3 w trakcie aktywacji komplementu i tym samym powodującego osłabienie ich aktywności enzymatycznej;
- wydzielanie polipeptydu SSL-7 wiążącego i blokującego składnik C5 dopełniacza;
- produkcję SAK, która jako aktywator plazminogenu pośrednio uczestniczy między innymi w enzymatycznej degradacji przeciwciał i składników komplementu [2, 4, 6, 13, 28].

Ingerencja *S. aureus* w proces wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów obejmuje zarówno mechanizmy tlenowe, związane z produkcją i przeciwdrobnoustrojowym działaniem reaktywnych form tlenu (np. anionu nadadtlenkowego, nadtlenu wodoru, rodników hydroksylowych, tlenu singletowego), jak i mechanizmy nie związane z tlenem – wynikające z bójczej aktywności związków wytwarzanych i depozowanych w ziarnistościach leukocytów (np. defensyn,

katelicydyn, białka BPI, lizozymu, laktoferyny, elastazy, katepsyny G, proteinazy 3). Istotną rolę odgrywają tu produkowane przez gronkowce enzymy:

- katalaza przeprowadza reakcję rozkładu H₂O₂;
- dysmutaza ponadtlenkowa inaktywuje anion ponadtlenkowy;
- reduktazy siarczanowe metioniny zapobiegają utlenianiu tego aminokwasu przez rodniki tlenowe;
- aureolizyna uczestniczy w uwalnianiu gronkowców z ziarnistości fagosomalnych i ich przechodzeniu do cytoplazmy [36].

Funkcję przeciwutleniacza pełni też produkowany przez *S. aureus* pomarańczowy barwnik karotenoidowy – stafyloksantyna [5, 31]. Ponadto liczne produkty gronkowców wykazują aktywność proteolityczną w stosunku do produkowanych przez komórki gospodarza peptydów bójczych. Należy tu ponownie przywołać stafylokinazę, która po utworzeniu kompleksów z α -defensynami blokuje ich aktywność przeciwdrobnoustrojową czy aureolizynę wykazującą zdolność degradacji katelicydyn [2, 4, 33]. *S. aureus* posiadają też zdolność częściowej neutralizacji ujemnego ładunku powierzchni ich komórek przez chemiczną modyfikację składników ściany komórkowej (udział białek Dlt i MprF), co obniża wrażliwość tych drobnoustrojów na atak eukariotycznych peptydów kationowych [4, 13, 15]. Opisane wyżej właściwości pozwalają gronkowcom skutecznie unikać działania mechanizmów obronnych ustroju gospodarza.

3. Aktywność immunomodulacyjna gronkowców

Ostatnio szczególną uwagę zwraca się na aktywność immunomodulacyjną składników/metabolitów uwalnianych/wydzielanych przez gronkowce, ujawnianą zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* w stosunku do komórek eukariotycznych. Do jednych z bardziej aktywnych biologicznie substancji zalicza się takie składniki ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, jak peptydoglikan oraz kwasy tejchojowe i lipotejchojowe. Pod względem oddziaływania na organizmy wyższe PG uznawany jest nawet za odpowiednik LPS bakterii Gram-ujemnych. Zarówno PG, jak i TA/LTA należą do składników PAMPs rozpoznawanych przez receptory TLR (Toll-like receptors) na komórkach gospodarza, czego efektem jest ich działanie chemotaktyczne w stosunku do leukocytów, stymulacja monocytów i makrofagów do wydzielania cytokin prozapalnych (w tym pirogennych, jak IL-1) i rodników tlenowych oraz aktywacja dopełniacza [20, 25, 37]. Szczególną aktywnością biologiczną charakteryzują się też toksyny gronkowcowe. Zwłaszcza hemolizyna α (α -toksyna), która oprócz klasycznej aktywności hemolitycznej wykazuje też właściwości leukotoksyczne (głównie

w stosunku do linii komórek monocytarno-makrofagowych), dermonekrotyczne, kardiotoksyczne, letalne, prozapalne i proapoptyczne [10, 23, 27]. Egzotoksyny gronkowcowe tworzące pory w błonach komórkowych należą do czynników zaangażowanych w procesy śmierci komórkowej. Wymienia się wśród nich: opisaną wyżej a-toksynę, leukocydynę Panton-Valentine (PVL) oraz toksynę zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1). Ich obecność w niewielkich stężeniach prowadzi do włączania najczęściej wewnętrznego (tzw. mitochondrialnego) szlaku apoptozy, podczas gdy wyższe stężenia tych toksyn zwykle powodują nekrozę komórek. Aktywność proapoptyczną i pronekrotyczną *S. aureus* wykazuje w stosunku do wielu typów komórek eukariotycznych, obejmujących zarówno komórki nabłonkowe, śródbłonkowe, jak i wchodzące w skład układu odpornościowego: limfocyty, monocyty, makrofagi czy neutrofile [17, 24, 35, 38]. Ujawnienie się tego typu aktywności immunomodulacyjnej drobnoustrojów *in vivo* może poważnie zakłócić prawidłowy przebieg procesu ich eliminacji i promować rozwój pełnoobjawowego zakażenia.

Uwalnianie/wydzielanie wielu składników/produktów drobnoustrojów (w tym gronkowców) do środowiska wzrostu zachodzi w sposób naturalny, często zamierzony przez same mikroorganizmy (związany z określoną fazą ich cyklu życiowego lub warunkami aktualnie panującymi w mikroniszy). Może również dochodzić do niego spontanicznie, w efekcie oddziaływania na komórki bakterii dodatkowych czynników zewnętrznych. Oprócz fizycznych czy chemicznych czynników pojawiających się w ekosystemach środowiskowych (np. siły mechaniczne, promieniowanie UV, promieniowanie jonizujące, chemikalia) zaliczyć można do nich także mechanizmy układu odpornościowego gospodarza, czy stosowane biocydy pozostające w stężeniach nieterapeutycznych (subinhibicyjnych). To ostatnie jest tym bardziej niepokojące, iż w trakcie prowadzenia antybiotykoterapii *in vivo*, podprogowe stężenia chemioterapeutyków zwykle najdłużej utrzymują się w tkankach, zwłaszcza tych trudno dostępnych. I tak, stwierdzono między innymi nasilone uwalnianie PG, LTA oraz a-toksyny u gronkowców w obecności antybiotyków b-laktamowych [22, 25, 39]. Istnieje więc wysokie prawdopodobieństwo zachodzenia, towarzyszącego antybiotykoterapii, przypadkowego uwalniania w ustroju gospodarza dużych ilości związków pochodzenia prokariotycznego, posiadających właściwości immunomodulacyjne. Warto też zauważyć, iż mogą one pochodzić nie tylko z komórek mikroorganizmów patogennych, ale także z drobnoustrojów wchodzących w skład mikroflory naturalnej pacjenta. Wymusza to konieczność wprowadzenia jeszcze bardziej ścisłej kontroli dozowania antybiotyków, obejmującej nie tylko ustalenie terapii celowa-

nej, ale także odpowiednich jej dawek, po uwzględnieniu parametrów farmakodynamicznych i farmakokinetycznych danego biocydu.

4. *S. aureus* jako wewnątrzkomórkowy patogen

Rozpatrując do niedawna nieznaną właściwość gronkowców nie sposób pominąć ich zdolności do przetrwania we wnętrzu komórek eukariotycznych. Drobnoustroje te nie są zaliczane do klasycznych wewnątrzkomórkowych patogenów (jak np. *Chlamydia* spp., *Legionella* spp. czy *Rickettsia* spp.), ale stale rośnie liczba doniesień wykazujących taką właśnie lokalizację *S. aureus* w organizmie gospodarza. Udowodniono zjawisko przeżywania gronkowców między innymi w komórkach nabłonkowych, śródbłonkowych, keratynocytach, fibroblastach, enterocytach, osteoblastach, a nawet w profesjonalnych fagocytach [1, 16, 21, 29]. W internalizację gronkowców z komórkami zaangażowane są mostki fibronektynowe tworzące się między powierzchniowymi białkami *S. aureus* wiążącymi fibronektynę a integrynami $\alpha_5\beta_1$ na komórkach. Zachodzi ona wówczas z wykorzystaniem tzw. mechanizmu zamka błyskawicznego i utworzeniem endosomu. W przypadku profesjonalnych fagocytów wiązanie gronkowców odbywa się przy udziale powierzchniowych receptorów tych komórek, np. receptorów dla fragmentów Fc immunoglobulin – FcR, dla składników dopełniacza – CR, receptorów rozpoznających wzorce molekularne patogenów – PRR i zwykle prowadzi do utworzenia klasycznego pseudopodium, a następnie fagosomu [12, 16, 21, 35]. Dalszy rozwój zdarzeń nadal pozostaje przedmiotem badań naukowych, choć w oparciu o dokonane obserwacje mikroskopowe można pokusić się o podanie kilku prawdopodobnych scenariuszy zachowania się gronkowców w komórkach. Drobnoustroje te mogą więc pozostawać w wakuolach endosomalnych lub uwalniać się do cytoplazmy komórek i tam namnażać, prowadząc ostatecznie do lizy komórek eukariotycznych. Rozpatruje się też możliwość przechodzenia *S. aureus* pozostających w cytoplazmie w mniej aktywne metabolicznie i dzięki temu słabiej wirulentne formy zwane SCV (small colony variants). Jednym z wykorzystywanych przez gronkowce sposobów przeżywania w komórkach, także w profesjonalnych fagocytach, wydaje się być autofagia i pozostawanie w utworzonych, otoczonych wieloma membranami autofagosomach lub we wnętrzu dużych wakuoli fagocytarnych – tzw. makropinosomach, które nie wykazują zdolności fuzji z lizosomami [1, 14, 16, 21]. Możliwe, iż gronkowce wykorzystują wszystkie z przedstawionych hipotetycznych scenariuszy w zależności od aktualnej sytuacji i/lub typu komórki eukariotycznej. Z całą pewnością można jednak powiedzieć,

iż wewnątrzkomórkowe przeżywanie gronkowców to dobra strategia funkcjonowania tych patogenów w ustroju gospodarza, zapewniająca im przede wszystkim ochronę przed działaniem jego humoralnych i komórkowych mechanizmów odpornościowych. Co więcej, często zachodząca *in vivo* wewnątrzkomórkowa lokalizacja tych bakterii oraz fakt łatwego tworzenia biofilmu przez gronkowce implikuje określone problemy diagnostyczne.

5. Podsumowanie

Choć gronkowce złoście umieszczają się na liście jednych z najlepiej poznanych drobnoustrojów, to wydaje się że jeszcze nie raz mogą zaskoczyć swoimi nowymi lub dotąd nieodkrytymi właściwościami. Wynika to z ich niezwykłych zdolności przystosowawczych do zmieniających się warunków otoczenia. Są to przecież drobnoustroje zamieszkujące zarówno środowiska abiotyczne, jak i bytujące w organizmach wyższych, włączając w to wnętrza komórek eukariotycznych. Mogą pozostawać w formach planktonowych lub tworzyć złożone, zarówno pod względem budowy, jak i fizjologii, struktury biofilmu. Posiadają i wykorzystują wyjątkowo szeroki zestaw różnorodnych czynników wirulencji, obejmujący zarówno integralne składniki komórkowe, jak i czynniki uwalniane do otoczenia. Są zdolne do immunomodulacji odpowiedzi odpornościowej ustroju gospodarza i skutecznie interferując z wszystkimi jej mechanizmami mogą pretendować do miana patogenu doskonałego.

Piśmiennictwo

- Bayles K.W., Wesson C.A., Liou L.E., Fox L.K., Bohach G.A., Trumble W.R.: Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**, 336–342 (1998)
- Bokarewa M.I., Jin T., Tarkowski A.: *Staphylococcus aureus*: staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 504–509 (2006)
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, **303**, 1532–1534 (2004)
- Chavakis T., Preissner K.T., Herrmann M.: The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol.* **28**, 408–418 (2007)
- Clauditz A., Resch 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)
- Colque-Navarro P., Palma M., Söderquist B., Flock J.-I., Möllby R.: Antibody responses in patients with staphylococcal septicemia against two *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins: clumping factor and an extracellular fibrinogen binding protein. *Clin. Diagn. Labor. Immunol.* **7**, 14–20 (2000)
- Cucarella C., Tormo M.A., Knecht E., Amorena B., Lasa I., Foster T.J., Penades J.R.: Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect. Immun.* **70**, 3180–3186 (2002)
- De Haas C.J.C., Veldkamp K.E., Peschel A., Weerkamp F., Van Wamel W.J.B., Heezius E.C.J.M., Poppelier M.J.J.G., Van Kassel K.P.M., Van Strip J.A.G.: Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J. Exp. Med.* **199**, 687–695 (2004)
- Delves P.J., Martin S.J., Burton D.R., Roitt I.M.: Roitt's essential immunology. Blackwell Publ., 2006, Wyd. XI
- Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M.: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 16–34 (2000)
- Dürr M.C., Kristian S.A., Otto M., Matteoli G., Margolis P.S., Trias J., van Kessel K.P., van Strijp J.A., Bohn E., Landmann R., Peschel A.: Neutrophil chemotaxis by pathogen-associated molecular patterns – formylated peptides are crucial but not the sole neutrophil attractants produced by *Staphylococcus aureus*. *Cell. Microbiol.* **8**, 207–217 (2006)
- Ernst R.K., Guina T., Miller S.I.: How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J. Infect. Dis.* **179**, S326–S330 (1999)
- Foster T.J.: Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 948–958 (2005)
- Garzoni C., Kelley W.L.: *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* **17**, 59–65 (2008)
- Götz F.: *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* **43**, 1367–1378 (2002)
- Gresham H.D., Lowrance J.H., Caver T.E., Wilson B.S., Cheung A.L., Lindberg F.P.: Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.* **164**, 3713–3722 (2000)
- Haslinger-Löffler B., Kahl B.C., Grundmeier M., Strangfeld K., Wagner B., Fischer U., Cheung A.L., Peters G., Schultze-Osthoff K., Sinha B.: Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell. Microbiol.* **7**, 1087–1097 (2005)
- Harraghy N., Hussain M., Haggag A., Chavakis T., Sinha B., Herrmann M., Flock J.-I.: The adhesive and immunomodulating properties of multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology*, **149**, 2701–2707 (2003)
- Hussain M., von Eiff C., Sinha B., Joost I., Herrmann M., Peters G., Becker K.: The *eap* gene as a novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 470–476 (2008)
- Jones K.J., Perris A.D., Vernallis A.B., Worthington T., Lambert P.L., Elliott T.S.J.: Induction of inflammatory cytokines and nitric oxide in J774.2 cells and murine macrophages by lipoteichoic acid and related cell wall antigens from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* **54**, 315–321 (2005)
- Kubica M., Guzik K., Kozieł J., Zarebski M., Richter W., Gajkowska B., Golda A., Maciag-Gudowska A., Brix K., Shaw L., Foster T., Potempa J.: A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLOS ONE*, **3**, e1409 (2008)
- Kuroda H., Kuroda M., Cui L., Hiramatsu K.: Subinhibitory concentrations of β -lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol. Lett.* **268**, 98–105 (2006)

23. Liang X, Ji Y.: Involvement of $\alpha 5\beta 1$ - integrin and TNF- α in *Staphylococcus aureus* α -toxin- induced death of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **9**, 1809–1821 (2007)
24. Lotz S., Aga E., Wilde I., van Zandbergen G., Hartung T., Solbach W., Laskay T.: Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 467–477 (2004)
25. Lotz S., Starke A., Ziemann C., Morath S., Hartung T., Solbach W., Laskay T.: β -lactam antibiotic-induced release of lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **5**, 15 (2006)
26. Luong T.T., Newell S.W., Lee C.Y.: *mgr*, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **185**, 3703–3710 (2003)
27. Menzies B.E., Kourteva I.: *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**, 39–45 (2000)
28. Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., Valle J., Solano C., Calvo E., Lopez J.A., Foster T.J., Penadés J.R., Lasa I.: Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **191**, 832–843 (2009)
29. Moisan H., Brouillette E., Jacob C.L., Langlois-Begin P., Michaud S., Malouin F.: Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J. Bacteriol.* **188**, 64–76 (2006)
30. Oehmcke S., Mörgelin M., Herwald H.: Activation of the human contact system on neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun.* **1**, 225–230 (2009)
31. 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)
32. Postma B., Poppelier M.J., van Galen J.C., Prossnitz E.R., van Strip J.A.G., de Haas C.J.C., van Kassel K.P.M.: Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J. Immunol.* **172**, 6994–7001 (2004)
33. Potempa J., Pike R.N.: Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* **1**, 70–87 (2009)
34. Shaw L., Golonka E., Potempa E., Foster S.J.: The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **150**, 217–228 (2004)
35. Smagur J., Guzik K., Magiera L., Bzowska M., Gruca M., Thogersen I.B., Enghild J.J., Potempa J.: A new pathway of staphylococcal pathogenesis: apoptosis-like death induced by staphopain B in human neutrophils and monocytes. *J. Innate Immun.* **1**, 98–108 (2009)
36. Urban C.F., Lourido S., Zychlinsky A.: How do microbes evade neutrophil killing? *Cell. Microbiol.* **8**, 1687–1696 (2006)
37. Wang J.E., Jorgensen P.F., Almlöf M., Thiemermann C., Foster S.J., Aasen A.O., Solberg R.: Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha and interleukin-6, and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect. Immun.* **68**, 3965–3970 (2000)
38. Wesson C.A., Geringer J., Liou L.E., Bayles K.W., Bohach G.A., Trumble W.R.: Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanisms involving caspases 8 and 3. *Infect. Immun.* **68**, 2998–3001 (2000)
39. Van Langevelde P., Van Dissel J.T., Ravensbergen E., Appelmelk B.J., Schrijver I.A., Groeneveld P.H.P.: Antibiotic-induced release of lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: quantitative measurements and biological reactivities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3073–3078 (1998)
40. Van Wamel W.J.B., Rooijackers S.H.M., Ruyken M., van Kassel K.P.M., van Srijp J.A.G.: The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* **188**, 1310–1315 (2006)
41. Yarwood J.M., Schlievert P.M.: Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* **112**, 1620–1625 (2003)

Agata Budkowska^{1*}, Patrick Maillard¹, Farzin Roohvand^{1,2}

¹Institut Pasteur, Unité Hépacivirus et Immunité Innée, 25/28 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

²Pasteur Institute of Teheran, AIDS and Hepatitis Department, Pasteur Ave, Teheran, Iran

1. Wstęp. 2. Cykl replikacyjny wzv C. 3. Rola lipoprotein w cyklu wirusowym. 4. Nowe inhibitory zakażenia. 5. Blokowanie zakażenia działaniem na lipoproteidy. 6. Mikrotubule jako nowy cel terapeutyczny. 7. Wnioski i perspektywy

Quest for new ways to prevent Hepatitis C virus infections

Abstract: Hepatitis C virus infection is a major cause of chronic liver disease, which can evolve to steatosis, cirrhosis and primary liver cancer. No HCV vaccine is available and current treatment, based on alfa interferon in association with ribavirin, leads to virus clearance in 50–80% of cases, is expensive and has considerable side effects. This stimulates constant search of new targets for anti-viral approaches by improving our knowledge of the virus cell cycle.

HCV represents unique model of virus-cell interaction, due to the central role of lipoproteins in the virus life cycle. Virus morphogenesis, takes place in association with lipid droplets and very low density lipoproteins (VLDL) are required for the production and release of virus particles from infected cells. Our studies concentrate on the mechanism of virus cell entry, its interaction with receptors and the role of triglycerid rich lipoproteins associated with virus particles in the initiation of infection. Our group has identified lipoprotein lipase (LPL) as an inhibitor of HCV infection. Another subject is the intracellular transport of virus structural proteins along the cytoskeletal, elements, especially microtubules. We have shown that virus cell entry, its transport and secretion from infected cells require fully functional microtubules. In addition, HCV core protein has a capacity to bind to tubulin, increasing microtubule polymerisation and permitting its intracellular transport.

Thus, lipoproteins associated with infectious virus particles, which are required for virus cell entry and transport on the microtubule network might be considered as new and attractive therapeutic targets for the development of new drugs anti viral-approaches.

1. Introduction. 2. HCV replication cycle. 3. Role of lipoproteins in the HCV life cycle. 4. New inhibitors of infection. 5. Blocking infection by acting on lipoproteins. 6. Microtubules as a new therapeutic target. 7. Conclusion and perspectives

Słowa kluczowe: wirus wzv C, infekcja komórki, cykl replikacyjny, cele terapeutyczne

Key words: hepatitis C virus (HCV), cell infection, replication cycle, therapeutic targets

1. Wstęp

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (wzv C) pozostaje ważnym problemem zdrowia publicznego. Liczba nosicieli wzv C na świecie jest oceniana na 130–170 mln, a w rzeczywistości prawdopodobnie znacznie więcej, gdyż większość zakażeń wzv C jest bezobjawowa. W 60–80% przypadków zakażenie przechodzi w przewlekłą chorobę wątroby, a konsekwencją wieloletniego nosicielstwa może być steatoza, marskość lub pierwotny rak wątroby (hepatocarcinoma). Tylko 3% osób zakażonych, jest poddawane leczeniu, opartym na podawaniu interferonu alfa w połączeniu z rybawiryną, które prowadzi do eliminacji wirusa w 50–80% przypadków, zależnie od jego genotypu. Terapia aktualnie stosowana jest kosztowna i powoduje poważne efekty uboczne [1].

Pomimo ogromnych wysiłków ciągle nie dysponujemy profilaktyczną ani terapeutyczną szczepionką przeciwko wzv C. Ciągła zmienność wirusa oraz fakt,

że nie znamy dokładnie jego struktury i mechanizmów odpornościowych prowadzących do eliminacji wzv C z zakażonego organizmu, leżą u podstaw trudności w przygotowaniu szczepionki i ulepszenia istniejących metod leczenia. Wysoki procent pacjentów nieodpowiadających na aktualne sposoby leczenia, zmusza nas do stałego poszukiwania nowych metod terapeutycznych, a przede wszystkim do proponowania nowych celów naszej ingerencji poprzez dokładne poznawanie cyklu komórkowego wirusa wzv C. W dodatku wzv C posiada niezwykłą zdolność stymulowania przewlekłego zakażenia, poprzez permanentną ucieczkę spod kontroli mechanizmów odpornościowych gospodarza: wrodzonej odpowiedzi immunologicznej zakażonych hepatocytów, jak również odpowiedzi humoralnej i komórkowej układu immunologicznego adaptacyjnego [podsumowane w 2, 3].

Prace naszego zespołu koncentrują się na badaniu mechanizmu wnikania wirusa do komórki, jego interakcji z receptorami na powierzchni hepatocyta (komórki

* Autor korespondencyjny: Institut Pasteur, Unité Hépacivirus et Immunité Innée, 25/28 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France; tel: 33-14568 8261; Fax: 33-14061 3012; e-mail: agata.budkowska@pasteur.fr

docelowej wzv C) i roli, jaką odgrywają lipoproteiny związane z cząstką wirusową w zapoczątkowaniu produktywnego zakażenia. Ten kluczowy etap cyklu wirusowego stanowi punkt centralny naszych badań, jako że ingerencja w jego przebieg może zablokować wczesne etapy zakażenia. Drugim tematem naszych badań jest mechanizm transportu wewnątrzkomórkowego komponentów strukturalnych wirusa na elementach cytoszkieletu – mikrotubulach, jako że wnikanie wirusa do komórki, jego transport, tworzenie kompleksów replikacyjnych, ale także późniejsze etapy cyklu takie jak morfogeneza i sekrecja cząstek wirusowych wymagają w pełni funkcjonalnych mikrotubul. Poznanie tych ważnych etapów cyklu, pozwoliło nam zaproponować dwa zasadnicze cele przyszłych interwencji terapeutycznych.

2. Cykl replikacyjny wzv C

Wzv C jest wirusem otoczkowym, z rodziny *Flaviviridae* (rząd *Hepacivirus*) zawierającym jednociowe RNA o polarności dodatniej, zbudowane z ok. 9000 nukleotydów. Wzv C jest wirusem zmiennym: mamy 7 genotypów i około 100 podtypów wirusa. W dodatku genom wirusowy, stale mutujący na skutek błędnej replikacji RNA podlega ciągłej ewolucji w zakażonym organizmie, a jego liczne formy („quasi-species”) są kolejno eliminowane przez odpowiedź immunologiczną [3]. Wirusowe RNA koduje jedną poliproteinę, zbudowaną z ok. 3000 aminokwasów, która jest dzielona przez proteazy komórkowe na 3 białka strukturalne: białko kapsydu oraz białka otoczki E1 i E2, a następnie przez proteazy wirusowe na białko P7 i 6 białek niestrukturalnych (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B) [4, 5]. Białka strukturalne tworzą cząstki wirusowe, podczas gdy białka niestrukturalne, np. helikaza-proteaza i RNA zależna RNA-polimeraza uczestniczą w replikacji genomu. Białka niestrukturalne NS2, NS3, NS5A and P7 uczestniczą również w produkcji zakaźnych cząstek wirusowych [6].

Cykl replikacyjny wirusa C przebiega całkowicie w cytoplazmie komórki wątroby (Rys. 1). Z przyczyn dotąd nieznanych jedynie człowiek i szympanś są wrażliwe na zakażenie, czynniki restrykcyjne są stale przedmiotem badań. Cykl wirusowy rozpoczyna interakcja wirusa z wieloma receptorami komórkowymi, a proces jego wnikania do komórki jest wieloetapowy. Biorą w nim udział proteoglikany (siarczan heparyny) [7], receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-R) [8], tzw. receptor „scavenger” (SR-BI) (oprócz głównego receptora wzv C, tetraspaniny CD-81 [10]. CD-81 tworzy kompleks i współdziała z receptorem SR-BI, ale co ważniejsze inicjuje kaskadę sygnalizacji komórkowej niezbędną do zapoczątkowania dalszych etapów

infekcji [11]. Wirus C wnika do komórki poprzez receptory umiejscowione w połączeniach ścisłych (tight junctions) „klaudynę” (CLD1) [12] i „okludynę” (OCLN) [13, 14]; ta ostatnia jest prawdziwym „kluczem” do rozpoczęcia infekcji.

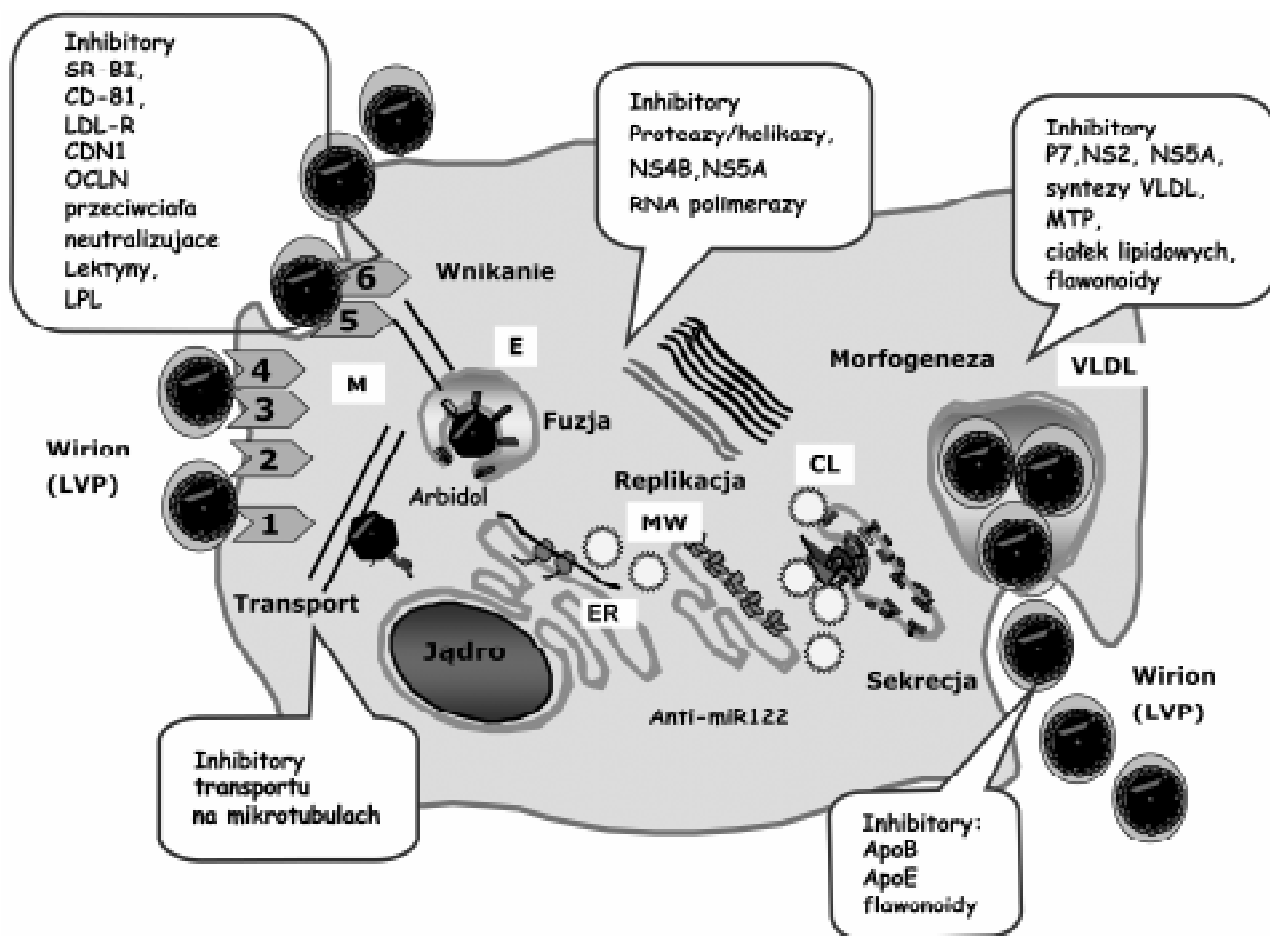
Wnikanie wirusa do komórki przebiega drogą endocytozy, zależnej od klatryny, która prowadzi do uwolnienia nukleokapsydu we wczesnych endosomach [15]. Fuzja białek otoczki z błoną endosomalną, jest zależna od niskiego pH i powoduje uwolnienie nukleokapsydu wirusowego umożliwiając tym samym ucieczkę wirusa od systemu degradacji lipoprotein w komórce wątroby.

Dalsze etapy cyklu to synteza i przetwarzanie poliproteiny, replikacja wirusowego RNA w tworach błoniastych zwanych „membranous webs” [16], a następnie morfogeneza cząstek wirusowych, ich transport i uwalnianie wirusa z zakażonej komórki w połączeniu z lipoproteinami o niskiej gęstości VLDL (patrz niżej).

3. Rola lipoprotein w cyklu wirusowym

Wirus wzv C reprezentuje zupełnie nowy i unikalny model interakcji wirusa z komórką docelową, poprzez centralną rolę lipoprotein w jego cyklu życiowym [17–19]. Ponieważ namnażanie się wirusa przebiega w wątrobie, głównym organie metabolizującym lipoproteiny, zakażenie wzv C powoduje poważne zmiany w ich metabolizmie, takie jak np. obniżone poziomy lipoprotein w przebiegu przewlekłej infekcji [20], lub gromadzenie się lipidów w komórkach parenchymalnych (steatoza) [21]. Z drugiej strony, replikacja wirusa C podlega regulacji przez kwasy tłuszczowe i proces geranylgeranylizacji [22], a morfogeneza wirusa przebiega w ścisłym kontakcie z ciałkami lipidowymi (lipid droplets), organellami wewnątrzkomórkowymi, magazynującymi neutralne lipidy [23, 24]. Tworzenie się cząstek wirusowych wymaga łączenia się białka nukleokapsydu z ciałkami lipidowymi: białko nukleokapsydu „mobilizuje” następnie białka niestrukturalne do membran, połączonych z ciałkami lipidowymi i zapoczątkowując w ten sposób proces morfogenezy [24].

Proces tworzenia zakaźnych cząstek wirusowych, ich transport i uwalnianie z zakażonej komórki wymaga ponadto ich połączenia z VLDL [25–27]. W rezultacie, zakaźne cząstki wirusowe, opuszczają zakażoną komórkę i krążą w surowicy ściśle związane z lipoproteinami bogatymi w trojglicerydy (TRL) [8, 28], tworząc tzw. „Viro-Lipo-Particles” (LVPs) [29], które niczym nie przypominają klasycznych wirionów. LVPs są utworzone przez lipoproteiny bogate w trojglicerydy (TRL) zawierające apolipoproteinę B (ApoB) and apolipoproteinę E (ApoE), nukleokapsydy wirusowe, oraz białka otoczki [29, 30]. Intrigującą sprawą jest obec-



Rys. 1. Cykl życiowy wirusa wzv C i jego potencjalne inhibitory

Wirus wzv C krąży w surowicy chorych w połączeniu z lipoproteinami zawierającymi ApoB i ApoE (głównie VLDL), tworząc tzw. Lipo-Virus Particles (LVPs). Początkowy etap wnikania wirusa do komórki docelowej (hepatocytu) jest zależny od lipoprotein, wiążących się z receptorem lekkich lipoprotein LDL-R (1) i/lub siarczanem heparyny (2). Wirus C może się również bezpośrednio wiązać z trzecim receptorem, SR-BI (3) poprzez lipoproteiny związane z cząstkami wirusowymi. SR-BI (3) tworzy kompleks z tetraspanina CD-81 (4) a interakcja wirusa z tą ostatnią, inicjuje sekwencje sygnalizacji niezbędnej do zapoczątkowania zakażenia. Wzvc wędruje następnie wraz z kompleksem SR-BI/CD-81 do połączeń ścisłych, gdzie reaguje z kolejnymi receptorami Klaudyna (CLDN1) (5) i okludyna (OKLN) (6). Wirus wnika do komórki drogą endocytozy, zależnej od klatryny i niskiego pH, po czym następuje fuzja glikoprotein otoczki z błoną endozomalną (E), uwolnienie nukleoekapsydu wirusowego. Wnikanie wirusa do komórki i jego wczesny transport zależą od sieci mikrotubul (M). Replikacja przebiega w błoniastych strukturach, zwanych „membranous web” (MW), a synteza białek w kontakcie z retikulum endoplazmatycznym (ER). Morfogeneza wymaga interakcji białek wirusowych (strukturalnych i niestrukturalnych) z ciałkami lipidowymi (CL), a następnie połączenia tworzących się cząstek wirusowych z VLDL, które warunkują ich sekrecję z zakażonej komórki. Zaznaczono również Arbidol (inhibitor fuzji) i anti-miR122 regulujący biosyntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu.

ność w LVPs ApoB48, produkowanej przez enterocyty, co mogłoby sugerować że część krążących cząstek wirusowych jest produkowana nie tylko w wątrobie, lecz również w enterocytach, wyłącznym miejscu syntezy ApoB48 [31].

4. Nowe inhibitory zakażenia

Wprowadzone w ostatnich latach dwa zasadnicze modele badań: tzw. replikony [32] dające możliwości analizy mechanizmu replikacji, ale przede wszystkim system produkcji wirusa C w komórkach hepatoma *in vitro* (tzw. model HCVcc), pozwalający na odtworzenie pełnego cyklu wirusa C [33, 34] – otworzyły nową epokę badań inhibitorów zakażenia komórki wzvc.

Inhibitory obecnie proponowane są skierowane głównie przeciwko nie-strukturalnym białkom wirusa niezbędnym do jego replikacji, a więc przeciw proteazie-helikazie wirusowej (NS3) i jej ko-faktorowi NS4A, jak również białku NS4B i uczestniczącym w formowaniu kompleksu replikacyjnego, RNA-zależnej RNA polimerazie (NS5B), i ostatnio opracowane środki przeciwko NS5A [6, 35].

Drugi typ leków aktualnie opracowywanych jest skierowany przeciwko białkom uczestniczącym w morfogenezie wzvc: p7 i NS2. Inny jeszcze typ leków blokuje syntezę i sekrecję VLDL zawierających ApoB (np. środki blokujące funkcję mikrosomalnego białka transportującego, Microsomal Transfer Protein, MTP) absolutnie niezbędnych do tworzenia zakaźnych wirionów.

Wiele badań prowadzonych aktualnie dotyczy leków blokujących proces wnikania wirusa do komórki: np. reagujących swoiście z niektórymi receptorami (jak CD-81 lub SR-BI lub ograniczających ich ekspresję na powierzchni komórki [posumowane w 18, 19, 35]. Rozważane jest użycie przeciwciał neutralizujących, które blokowałyby wczesne etapy cyklu ale następujące po adsorpcji wirusa na powierzchni komórki [36], lub też lektyn reagujących z glikoproteinami otoczki [37]. Niestety ogromna większość proponowanych leków ma właściwości toksyczne lub powoduje poważne efekty uboczne i jedynie nieliczne są dopuszczane do prób klinicznych [6, 35].

5. Blokowanie zakażenia działaniem na lipoproteiny

Charakterystyczną i unikalną cechą wzw C jest zależność procesu infekcji komórki od metabolizmu lipoprotein. W rozpoznawaniu wirusa i jego internalizacji uczestniczą więc receptory i cząsteczki pośredniczące również w metabolizmie lipoprotein, takie jak: proteoglikany (siarczan heparyny) [7] receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-R) [8] i receptor „scavenger” (SR-BI) [9], oprócz głównego receptora wzw C, tetraspaniny CD-81 [10] i receptorów umiejscowionych w połączeniach ścisłych [12–14].

Lipoproteiny, jak również ich podstawowe składniki białkowe (Apolipoproteiny) są uznanymi regulatorami zakażenia wzw C. Tak więc naturalne ligandy SB-BI, jak VLDL [39] jak również utlenione LDL, powstające w przebiegu zakażenia [40] są inhibitorami wnikania wirusa do komórki, podczas gdy ciężkie lipoproteiny (HDL) wzmagają infekcje, aktywując funkcje receptora SR-BI lub modyfikując strukturę błony komórkowej [41]. Apolipoproteiny ApoC1, ApoB czy ApoE [25, 26] są również naturalnymi regulatorami zakażenia.

Zaproponowane ostatnio środki regulujące metabolizm lipoprotein to małe si-RNA blokujące produkcję ApoB i ApoE, naringinina – flawonoid wpływający na sekrecję cząstek wirusowych, a przede wszystkim Mikro-RNA122 regulujące biosyntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu niezbędnych dla replikacji wirusa [35].

Nasze badania pokazały, że lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL), ściśle związane z cząstkami wirusowymi, rozpoznają receptor SR-BI na powierzchni komórki, wiążą się z nim i ułatwiają wnikanie wzw C do komórki [39]. Wirus więc nie oddziałuje pierwotnie z receptorem SR-BI poprzez białka E1 i E2 otoczki, lecz poprzez lipoproteiny zawierające ApoB wchodzące w skład jego struktury. Lipoproteiny również „transportują” cząstki wirusowe do komórki, ochraniając je jednocześnie przed atakiem przeciwciał neutrali-

zujących [39]. Grają w ten sposób zasadniczą rolę w mechanizmach ucieczki wirusa spod kontroli układu immunologicznego gospodarza. Obserwacje nasze wyjaśniają, dlaczego odpowiedź humoralna skierowana przeciwko białkom otoczki nie jest w stanie wyeliminować wirusa z zakażonego ustroju i dlaczego wirus może współistnieć z przeciwciałami potencjalnie neutralizującymi w surowicy chorych [36]. Dane te są również zgodne z wynikami eksperymentów na szympancach pokazujących, że białka otoczki używane jako immunogeny nie są w stanie zapewnić całkowitej ochrony przeciwko zakażeniu wirusem C, jedynie w najlepszym wypadku osłabić infekcję [42].

Badania nasze sugerują, że oddziaływanie na lipoproteiny związane z cząstkami wirusowymi mogłoby stanowić nowy cel terapeutyczny. Są one zgodne z obserwacjami, że lipoproteiny związane z wirusem warunkują jego zakaźność [43]. Prace nasze pokazały, że nie tylko naturalne ligandy receptora SR-BI blokują jego interakcje z wirusem [39], ale również przeciwciała skierowane przeciwko β -lipoproteinom, związanym z cząstką wirusową blokują infekcje w systemie HCVcc *in vitro* [44].

Wychodząc z założenia, że oddziaływanie na lipoproteiny związane z wirusem C może zmodyfikować przebieg infekcji, nasz zespół zidentyfikował nowy, naturalny inhibitor zakażenia wzw C – lipazę lipoproteinową (LPL) [44]. LPL jest enzymem lipolitycznym, kluczowym w metabolizmie lipoprotein. Oprócz aktywności lipolitycznej, hydrolizującej lipoproteiny bogate w trójglicerydy (VLDL i chylomikrony), enzym ten ma zdolność wprowadzania lipoprotein do komórki wątroby, kierując je na drogę degradacji. Mechanizm działania LPL polega na tworzeniu „pomostu” („bridging”) między lipoproteiną i siarczanem heparyny na powierzchni komórki, oraz wprowadzeniu lipoproteiny do jej wnętrza. Nasze badania wykazały, że LPL oddziałuje podobnie z wirusem C: LPL tworzy mianowicie „pomost” między lipoproteinami otaczającymi cząstkę wirusową i siarczanem heparyny na powierzchni hepatocytu, prowadząc do internalizacji wirusa do wnętrza komórki. Ta bardzo specjalna droga wnikania jest przeznaczona dla lipoprotein bogatych w trójglicerydy i zupełnie różna od normalnej drogi wnikania wirusa C do komórki. Dla wirusa wyprodukowanego w systemie doświadczalnym HCVcc [44] jak również w modelu doświadczalnym *in vivo* (u myszy z przeszczepionymi komórkami wątroby ludzkiej) LPL jest efektywnym inhibitorem infekcji (M. Walic i wsp., manuskrypt w przygotowaniu). I to nie aktywność lipolityczna enzymu powoduje neutralizację wirusa, lecz właśnie jego druga funkcja, tzw. „bridging”: LPL wprowadzając wirusa C do komórki drogą przeznaczoną dla lipoprotein prowadzi prawdopodobnie do jego degradacji a więc do

poronnej infekcji. Ta hipoteza jest badana aktualnie przez nasz zespół.

Nasze badania sugerują, że lipoproteiny związane z zakaźną cząstką wirusową, które umożliwiają jego prawidłowe wnikanie do komórki i zapewniają infekcyjność, mogą być rozważane, jako cel terapeutyczny przy opracowywaniu nowych metod leczenia zakażenia wirusem wzv C.

6. Mikrotubule jako nowy cel terapeutyczny

Inną szczególną cechą wirusa C jest zależność jego cyklu komórkowego od dynamicznych mikrotubul. Wiadomo, że replikacja wirusowego RNA przebiega w kompleksie replikacyjnym, usytuowanym w błonistych strukturach komórkowych zwanych „membranous web” [16]. Kompleksy replikacyjne podlegają transportowi, a ich dynamiczna organizacja jest ściśle związana z retikulum endoplazmatycznym, włóknami aktyny, oraz siecią mikrotubul [45, 46]. Jakkolwiek, sposób transportu komponentów strukturalnych wirusa C wewnątrz komórki pozostawał do niedawna nieznanym.

Liczne wirusy wymagają wewnątrzkomórkowego transportu ich białek za pośrednictwem mikrotubul – mechanizmy te jednakże zależą zwykle od tzw motorów mikrotubularnych, pośredniczących w transporcie: kinezyne lub dyneiny. W przypadku wirusa C, pokazaliśmy, że może on korzystać z sieci mikrotubul, używając dwóch różnych sposobów transportu jego białka nukleokapsydu: klasycznego, w którym uczestniczy dyneina [47], i zupełnie nowego, zależnego od mechanizmów polimeryzacji mikrotubul [48].

Przy współpracy z J. M c L a u c h l a n e m (University of Glasgow) pokazaliśmy że białko nukleokapsydu przemieszcza się w zakażonej komórce na sieci mikrotubul, koncentrując się w rejonie okołojądrowym, miejscu morfogenezy wirusa [47]. Transport ten zależy od dyneiny i uwarunkowany jest połączeniem białka kapsydowego z ciałkami lipidowymi, które używają ten typ transportu w komórce. Pokazaliśmy następnie, że oprócz tego „klasycznego” sposobu transportu, białko nukleokapsydu może wiązać się bezpośrednio z tubuliną, podstawowym składnikiem mikrotubul, zwiększając stopień ich polimeryzacji i umożliwiając w ten sposób transport nukleokapsydu za ich pośrednictwem w zakażonej komórce [48].

Destrukcja mikrotubul lub nawet lekka modyfikacja ich funkcji biologicznych takimi środkami jak vinblastyna czy taxol, powoduje dramatyczny spadek produkcji wirusa w hodowli komórkowej *in vitro* (model HCVcc) [48]. Używając modelu cząstek pseudotypowych (HCVpp) udowodniliśmy, że już najwcześniejszy etap wnikania wirusa do komórki, od momentu związania się cząstki wirusowej z błoną komórkową, do fuzji

białek otoczki z błoną endozomalną – wymaga pośrednictwa mikrotubul. Dalsze badania, z użyciem modelu infekcji HCVcc (JFH1) oraz podobnych środków chemicznych modyfikujących strukturę i/lub funkcje mikrotubul, pokazały, że również dalsze etapy cyklu, następujące kilka godzin po wniknięciu wirusa do komórki, wymagają nienaruszonych i w pełni funkcjonalnych mikrotubul. W dodatku transport na tym etapie zakażenia przebiega w sposób absolutnie oryginalny, gdyż jest zależny od polimeryzacji mikrotubul: a więc albo ich dynamiki albo jeszcze nie całkowicie poznanego procesu, zwanego „treadmilling” [49]. Przy tej okazji odkryliśmy unikalną właściwość białka nukleokapsydu wzv C: jego zdolność wiązania się bezpośrednio z tubuliną z bardzo wysokim powinowactwem. Wiążąc się z tubuliną białko nukleokapsydu zwiększa stopień polimeryzacji mikrotubul [48]. Obserwacje te sugerują, że białko nukleokapsydu posiada prawdopodobnie zdolność korzystania z tych szczególnych właściwości *in vivo*: łączenie się z siecią mikrotubul i uczestniczenie w procesie ich polimeryzacji umożliwiłoby transport białka nukleokapsydu w zakażonej komórce. Ten sposób przemieszczania jest bardzo oryginalny i znany zaledwie dla kilku białek wirusowych, takich jak białko Tat wirusa HIV, oraz dla dwóch białek wirusów roślinnych. Zgodnie z hipotezą, że taki proces mógłby mieć miejsce w zakażonej komórce, pokazaliśmy ko-lokalizację białka nukleokapsydu z siecią mikrotubul w zakażonych komórkach hepatoma, w mikroskopie konfokalnym, a co ciekawsze również połączenie białka nukleokapsydu z mikrotubulami, polimeryzowanymi w jego obecności, w mikroskopie elektronowym używając techniki immuno-elektromikroskopii i przeciwciał skierowanych przeciw białku kapsydu wzv C [48]. Inne nasze prace pokazały, że wirus C wykorzystuje również transport za pośrednictwem mikrotubul do formowania cząstek wirusowych i ich sekrecji z zakażonej komórki [47].

7. Wnioski i perspektywy

Dalsze postępy naszej wiedzy dotyczące mechanizmów prowadzących do rozpoczęcia zakażenia i dokładne poznanie cyklu komórkowego wirusa C pozwoli nam zaproponować nowe inhibitory i nowe sposoby terapeutyczne. Aby przeciwdziałać procesowi wnikania wirusa do komórki: cykliczne peptydy syntetyczne, lektyny lub środki wpływające na funkcję lub ekspresję receptorów wzv C, mogłyby być stosowane obok obecnie opracowywanych inhibitorów proteazy-helikazy lub RNA polimerazy. Wszystkie te środki byłyby prawdopodobnie stosowane w połączeniu z już istniejącym leczeniem wzv C, by podnieść jego efektywność [1, 6, 35].

Wirus zwz C bezspornie reprezentuje zupełnie nowy model oddziaływania wirusa z zakaźnym organizmem ze względu na centralną rolę lipoprotein w jego cyklu życiowym. Charakteryzuje go zależność strukturalna i funkcjonalna zakaźnych wirionów, krążących w surowicy od lipoprotein, a więc: wymaganie VLDL do tworzenia i sekrecji cząstek wirusowych, mechanizm zakażenia komórki zależny od lipoprotein i ich receptorów by osiągnąć efektywną infekcję, w końcu wpływ namnażania się wirusa na metabolizm lipidów i lipoprotein ustroju. Mimo wzrastającego uznania kluczowej roli lipoprotein w cyklu życiowym wirusa zwz C, struktura zakaźnej cząstki wirusowej, jak również procesy komórkowe prowadzące do jej produkcji i sekrecji stanowią najmniej znane etapy tego cyklu. Nawet jeżeli nie znamy wszystkich szczegółów tych procesów, nasze prace sugerują, że oddziaływanie na lipoproteiny związane z cząstkami wirusowymi, warunkujące jego potencjał zakaźny, mogłoby stanowić nowy cel terapeutyczny, zmierzający do zablokowania lub przynajmniej obniżenia poziomu infekcji.

Inna oryginalność zwz C stanowi zależność procesu infekcji oraz transportu komponent wirusa poprzez sieć mikrotubul na różnych etapach jego cyklu. Nasze obserwacje sugerują, że aby zakazić komórkę wirus zwz C może w sposób oryginalny wykorzystywać mechanizmy transportu na mikrotubulach zależne od ich polimeryzacji, w których białko nukleokapsydu wirusowego gra bardzo szczególną rolę.

Tak więc mikrotubule mogłyby stanowić również zupełnie nowy i interesujący cel terapeutyczny. Środki wpływające na strukturę lub funkcję mikrotubul są używane w leczeniu pewnych typów raka. Prace ostatnio prowadzone przez nasz zespół pozwoliły zidentyfikować fragment białka kapsydu zwz C, odpowiedzialny za jego interakcję z tubuliną i mikrotubulami (F. R o o h v a n d i wsp., w przygotowaniu). Przyszłe badania pokażą czy użycie tego fragmentu jako inhibitora pozwoli zablokować lub osłabić infekcję zwz C.

Piśmiennictwo

1. Zeuzem S., Berg T., Moeller B., Hinrichsen H., Mauss S., Wedemeyer H., Sarrazin C., Hueppe D., Zehnter E., Manns M.P.: Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepatitis*. **16**, 75–90 (2009)
2. Gale M., Jr., Foy E., M.: Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*, **436**, 939–45 (2005)
3. Rehermann B., Nascimbeni M.: Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 215–29 (2005)
4. Bartenschlager R., Frese M., Pietschmann T.: Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv. Virus Res.* **63**, 71–180 (2004)
5. Brass V., Moradpour D., Blum H.E.: Molecular virology of hepatitis C virus (HCV), update. *Int. J. Med. Sci.* **3**, 29–34 (2006)
6. Lanford R.E., Evans M.J., Lohmann V., Lindenbach B., Gale M., Jr., Rehermann B., Chang K.M., Lemon S.M.: The accelerating pace of HCV research: a summary of the 15th International Symposium on Hepatitis C Virus And Related Viruses. *Gastroenterology*, **136**, 9–16 (2009)
7. Barth H., Baumert T.F. i wsp.: Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.* **278**, 41003–41012 (2003)
8. Agnello V., Abel G., Elfahal M., Knight G.B., Zhang Q.X.: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **96**, 12766–71 (1999)
9. Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R., Vitelli A.: The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017–5025 (2002)
10. Pileri P., Abrignani S. i wsp.: Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **282**, 938–941 (1998)
11. Brazzoli M., Bianchi A., Filippini S., Weiner A., Zhu Q., Pizza M., Crotta S.: CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J. Virol.* **82**, 8316–8329 (2008)
12. Evans M.J., von Hahn T., Tschernie D.M., Syder A.J., Panis M., Wolk B., Hatzioannou T., McKeating J.A., Bieniasz P.D., Rice C.M.: Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, **446**, 801–805 (2007)
13. Liu S., Yang W., Shen L., Turner J.R., Coyne C.B., Wang T.: Tight Junction proteins Claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are down-regulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* **83**, 2011–2014 (2009)
14. Ploss A., Evans M.J., Gaysinskaya V.A., Panis M., You H., de Jong Y.P., Rice C.M.: Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, **457**, 882–886 (2009)
15. Blanchard E., Belouzard S., Goueslain L., Wakita T., Dubuisson J., Wychowski C., Rouille Y.: Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**, 6964–6972 (2006)
16. Gosert R., Egger D., Lohmann V., Bartenschlager R., Blum E.H., Bienz K., Moradpour D.: Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harbouring subgenomic replicons. *J. Virol.* **77**, 5487–5492 (2003)
17. Andre P., Perlemuter G., Budkowska A., Brechet C., Lotteau V.: Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Sem. Liver Dis.* **25**, 93–104 (2005)
18. Burlone M.E., Budkowska A.: Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J. Gen. Virol.* **90**, 1055–1070 (2009)
19. Budkowska A.: Mechanism of cell infection with hepatitis C virus (HCV) – a new paradigm in virus-cell interaction. *Polish J. Microbiol.* **58**, 93–8 (2009)
20. Petit J.M., Benichou M., Duvillard L., Jooste V., Bour J.B., Minello A., Verges B., Brun J.M., Gambert P., Hillon P.: Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 1150–1154 (2003)
21. Roingard P., Houriou C.: Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J. Viral. Hep.* **15**, 157–164 (2007)
22. Kapadia S.B., Chisari F.V.: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2561–2566 (2005)
23. Boulant S., Targett-Adams P., McLauchlan J.: Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid

- droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J. Gen. Virol.* **88**, 2204–2213 (2007)
24. Miyanari Y., Atsuzawa K., Usuda N., Watashi K., Hishiki T., Zayas M., Bartenschlager R., Wakita T., Hijikata M., Shimotohno K.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell. Biol.* **9**, 1089–1097 (2007)
 25. Huang H., Sun F., Owen D. M., Li W., Chen Y., Gale M., Jr., Ye J.: Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5848–5853 (2007)
 26. Chang K.S., Jiang J., Cai Z., Luo G.: Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J. Virol.* **81**, 13783–13793 (2007)
 27. Gastaminza P., Cheng G., Wieland S., Zhong J., Liao W., Chisari F.V.: Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* **82**, 2120–2129 (2008)
 28. Thomssen R., Bonk S., Propfe C., Heermann K.H., Kochel H.G., Uy A.: Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol.* **181**, 293–300 (1992)
 29. Andre P., Komurian-Pradel F., Deforges S., Perret M., Berland J.L., Sodoyer M., Pol S., Brechot C., Paranhos-Baccala G., Lotteau V.: Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J. Virol.* **76**, 6919–6928 (2002)
 30. Nielsen S.U., Bassendine M.F., Burt A.D., Martin C., Pumechokchai W., Toms G.L.: Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J. Virol.* **80**, 2418–2428 (2006)
 31. Diaz O., Delers F., Maynard M., Demignot S., Zoulim F., Chambaz J., Trepo C., Lotteau V., Andre P.: Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J. Gen. Virol.* **87**, 2983–2991 (2006)
 32. Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R.: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110–113 (1999).
 33. Lindenbach B., Rice C.M. i wsp.: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, **309**, 623–6, (2005)
 34. Wakita T., Liang T.J. i wsp.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Med.* **11**, 791–796 (2005).
 35. Pawlotky J.M., Cocquerel L., Durantel D., Lavilette D., Lerat H., Pecheur E.I., Polyak S.J., Tautz N., Thimme R.: HCV Research 20 years after discovery: a summary of the 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, *Gastroenterology*, **138**, 6–12 (2010)
 36. Haberstroh A., Baumert T.F. i wsp.: Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology*, **135**, 1719–1728 (2008)
 37. Helle F., Wychowski C., Vu-Dac N., Gustafson K.R., Voisset C., Dubuisson J.: Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J. Biol. Chem.* **281**, 25177–25183 (2006)
 38. Ye J.: Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. *PLoS Pathogen*, **3**, e108, (2007)
 39. Maillard P., Huby T., Andreo U., Moreau M., Chapman J., Budkowska A.: The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/ClA1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J.* **20**, 735–737 (2006)
 40. Von Hahn T., Lindenbach B.D., Boullier A., Quehenberger O., Paulson M., Rice C.M., McKeating J.A.: Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology*, **43**, 932–942 (2006)
 41. Voisset C., Callens N., Blanchard E., Op De Beeck A., Dubuisson J., Vu-Dac N.: High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J. Biol. Chem.* **280**, 7793–7799, (2005)
 42. Houghton M., Abrigiani S.: Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*, **436**, 961–966 (2005)
 43. Lindenbach B., Rice C.M. i wsp.: Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3805–3809 (2006)
 44. Andreo U., Maillard P., Kalina O., Walic M., Meurs E., Martinot M., Marcellin P., Budkowska A.: Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol.* **9**, 2445–56 (2007)
 45. Lai C.K., Jeng K.S., Machida K., Lai M.M.: Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *J. Virol.* **82**, 8838–8848 (2008)
 46. Wolk B., Buchele B., Moradpour D., Rice C.M.: A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.* **82**, 10519–10531 (2008)
 47. Boulant S., Douglas M.W., Moody L., Budkowska A., Targett-Adams P., McLauchlan J.: Hepatitis C Virus Core Protein Induces Lipid Droplet Redistribution in a Microtubule- and Dynein-Dependent Manner. *Traffic*, **9**, 1268–1282 (2008)
 48. Roohvand F., Maillard P., Lavergne J.P., Boulant S., Walic M., Andréo U., Goueslain L., Helle F., Mallet A., McLauchlan J., Budkowska A.: Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem.* **284**, 13778–13791 (2009)
 49. Rodinov V.I., Borisy G.G.: Microtubules treadmill *in vivo*. *Science*, **275**, 215–218 (1999)

Wykład przedstawiony na Konferencji naukowej „Mikrobiologia 100 lat po Robertcie Kochu”
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Warszawie w dniach 30–31 sierpnia 2010 r.

Elżbieta Samorek-Salamonowicz^{1*}, Jowita Samanta Niczyporuk¹

¹Zakład Chorób Wirusowych Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

1. Wstęp. 2. Historia występowania WNV. 3. Rozprzestrzenienie WNV. 4. Wrażliwość na zakażenie WNV ptaków. 5. Objawy chorobowe u ludzi. 6. WNV w Polsce. 7. Podsumowanie informacji o WNV. 8. Gorączki krwotoczne. 9. Podsumowanie

West Nile virus other emerging threats to public health

Abstract: West Nile virus is an icosahedral, spherical (50 nm in diameter) arbovirus of the Flaviviridae family. Its genome contains single-stranded RNA with positive polarity (ssRNA+). Virions are build of three structural proteins: envelope glycoprotein E, core protein C and membrane protein prM. Apart from them, the virus genome codes for seven non-structural proteins: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, and NS5. Transmission vectors of WNV are mosquitoes of the *Culex pipiens* species and other blood-eating insects. Its main reservoir are migrating birds, whereas humans and other mammals are its occasional host. West Nile Virus shows high neurotropism and is the cause of morbidity and mortality in different animals and humans. During the last ten years, it has been identified in Asia, Africa, Europe and both Americas. WNV was found in Poland too. This paper considers also the new haemorrhagic fever and SARS.

1. Introduction. 2. Discovery of WNV. 3. Distribution of WNV. 4. Susceptibility of birds to the WNV infection. 5. Clinical symptoms in humans. 6. WNV in Poland. 7. Summarizing information about WNV. 8. Haemorrhagic fever. 9. Summary

Słowa kluczowe: wirus Zachodniego Nilu, wirus denga, filowirusy, nairovirus SARS

Key words: West Nile virus, virus denga, filoviruses, nairoviruses, SARS

1. Wstęp

Wirus Zachodniego Nilu (WNV) należy do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Flavivirus*. Tworzy kompleks antygenowy japońskiego zapalenia mózgu wraz z wirusem japońskiego zapalenia mózgu, wirusem Kunjin, wirusem zapalenia mózgu Murray Valley oraz wirusem zapalenia mózgu St. Louis. Jest to otoczkowy wirus (+)ssRNA, jego kapsyd o wielkości 40–60 nm ma symetrię dwudziestościenną. Pojedyncza otwarta ramka odczytu (ORF) o długości 12,000 par zasad ograniczona jest krótkimi konserwatywnymi regionami niekodującymi. Genom wirusa koduje trzy białka strukturalne: glikoproteinę otoczkową E, białko kapsydu C i białko premembranowe prM oraz siedem białek niestrukturalnych: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 [16].

2. Historia występowania WNV

Wirus Zachodniego Nilu po raz pierwszy został wyizolowany w 1937 r. z surowicy krwi gorączkującej kobiety w dystrykcie zachodniego Nilu w Ugandzie [25]. Od tamtego czasu poszerzał zasięg swego występowania. W latach pięćdziesiątych pojawił się w Egip-

cie oraz w Izraelu, w którym spowodował zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u kilkunastu osób w domu opieki. W kolejnych latach rozprzestrzenił się na Kongo, Pakistan, Indonezję oraz RPA. Europa była wolna od WNV aż do roku 1963 r., kiedy to wirus po raz pierwszy izolowano od chorych pacjentów w deltach Rodanu i Wołgi [21]. W regionie Bukaresztu w Rumunii odnotowano ponad 500 klinicznych przypadków WNF przebiegających w wysokim procencie z objawami neurologicznymi i wysoką śmiertelnością, sięgającą powyżej 10% [3]. W 1999 r. na przełomie sierpnia i września wirus pojawił się ponownie w rejonie Wołgogradu w Rosji, gdzie odnotowano 826 przypadków ostrego zapalenia opon mózgowych i mózgu przebiegających z wysoką gorączką. Około 5% chorych zmarło. Wszystkie przypadki zostały potwierdzone serologicznie [21]. WNV izolowano następnie w Portugalii, Słowacji, Mołdawii, Ukrainie, Francji, Węgrzech, Czechach i Włoszech [11, 27]. Do Stanów Zjednoczonych, do Nowego Yorku został zawleczony w 1999 r. Odnotowano wówczas 56 potwierdzonych przypadków zakażenia wirusem, w tym 7 śmiertelnych. W tym samym czasie obserwowano masowe padnięcia kraków i ptaków egzotycznych w ZOO [10]. Wirus gwałtownie rozprzestrzenił się i zaatakował całe terytorium

* Autor korespondencyjny: Zakład Chorób Wirusowych Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: elsam@piwet.pulawy.pl

Stanów Zjednoczonych. Do chwili obecnej wśród ludzi rocznie notuje się ponad 1000 potwierdzonych przypadków zapalenia opon mózgowych i zapalenia mózgu na skutek zakażenia WNV [2]. Zakażone zostały oprócz człowieka, także ptaki i inne zwierzęta.

3. Rozprzestrzenienie WNV

Rezerwuarem wirusa są dzikie wodno-błotne ptaki tropikalne oraz wędrownie różnych gatunków. Wykazano, że zakażeniu WNV ulega około 135 gatunków ptaków. Wektorem wirusa jest duża grupa hematofagicznych muchówek, do których należą: komary (*Culicidae*, *Anopheles*, *Culiseta*), rzadko kleszcze (*Ixodidae*), kuczmany (*Ceratopogonidae*), meszki (*Simuliidae*), ślepaki (*Tabanidae*). Obecność WNV stwierdzono u ponad 150 gatunków komarów, z czego 12 gatunków występuje w Polsce [25].

Główną rolę w przenoszeniu wirusa odgrywiają komary ze względu na ich antropofilność oraz plagowe występowanie w okresach wzmożonej aktywności trwającej w naszym klimacie od wczesnego lata do późnej jesieni. Jednakże wirus utrzymuje się w ciele hibernujących samic komara podczas zimy, a następnie gdy temperatura ulegnie podwyższeniu wylęga się zakażone transowarialnie pokolenie zakażające żywiciela podczas pobierania krwi [14].

Wirus rozprzestrzenia się wraz z ptakami podczas ich przelotów. Oprócz ptaków znaczną rolę w rozprzestrzenianiu wirusa spełnia człowiek. Zarówno legalny import, jak również nielegalny przemyt zakażonych ptaków drogą lotniczą, promową, samochodami jak i innymi środkami transportu może przyczynić się do przeniesienia wirusa na odległe obszary globu, nawet na inne kontynenty.

Zakażenie człowiek-człowiek może mieć miejsce podczas transfuzji krwi oraz poprzez transplantację organów [12]. Odnotowano także przypadki zakażenia niemowlęcia przez karmiącą matkę oraz zakażenie wewnątrzmaciczne. Możliwe są także zakażenia pracowników laboratoriów podczas wykonywania sekcji zakażonych ptaków. Podejrzewa się, że patogen ten, może zostać użyty przez terrorystów podczas ataku bioterrorystycznego [7].

4. Wrażliwość na zakażenie WNV ptaków

Wirus Zachodniego Nilu jest chorobotwórczy dla różnych gatunków dzikich ptaków wędrownych, ptaków drapieżnych, drobiu oraz ssaków w tym dla ludzi. Obecność wirusa WN stwierdzono u ponad 135 gatunków ptaków. Ptaki dzikie stanowią rezerwuariusz wirusa w środowisku [19]. Głównie są to ptaki krukowate takie jak: wrony, kruki, sójki oraz ptaki drapieżne,

do których możemy zaliczyć jastrzębie, sokoły oraz sowy. Wrażliwy na zakażenie wirusem jest drób, a w szczególności gęsi, czego przykładem były epidemie w 1997 r. w Izraelu, w 2001 r. w Rumunii oraz 2003 r. na Węgrzech [5, 11].

Ptaki zakażone wirusem Zachodniego Nilu są osłabione i stwierdza się u nich szereg objawów neurologicznych, takich jak ataksję, drgawki, ułożenie szyi w kształcie litery S, niezdolność ruchów, anizokorię, ptaki wodne pływają zataczając koła [5, 17]. Wśród zmian anatomopatologicznych najczęściej są widoczne krwiaki podtwardówkowe w mózdzku, przekrwienie mózgu, wybroczyny krwawe w tkance mięśnia sercowego, zapalenie mięśnia sercowego i nasierdza, zanik mięśni piersiowych, ogniska nekrotyczne w wątrobie.

5. Objawy chorobowe u ludzi

Najczęściej około 80% zakażeń przebiega bezobjawowo, okres inkubacji choroby wynosi od 2 do 10 dni. Wiremia trwa krótko, kończąc się przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby manifestujących się bólem głowy, złym samopoczuciem, brakiem apetytu, nudnościami, zawrotami głowy, bólami mięśniowymi, plamisto-grudkową wysypką oraz powiększeniem węzłów chłonnych. Po upływie 3 do 6 dni objawy zanikają samoistnie. Ciężki przebieg choroby z objawami zapalenia opon mózgowych i zapalenie mózgu występuje w 1 przypadku na 150 zakażonych osób. Głównymi objawami w ciężkim przebiegu choroby jest ataksja, zapalenie nerwów rdzenia kręgowego, niedowłady, zapalenie nerwu wzrokowego oraz zespół objawów przypominających chorobę Parkinsona. Śmiertelność chorych hospitalizowanych wynosi 2–14% (maksymalnie 35%). U dzieci zakażenie wirusem przebiega najczęściej bardzo łagodnie [1, 9, 15].

6. WNV w Polsce

Badania przeprowadzone w latach 1995–1996 wykonane metodą zahamowania hemaglutynacji, wykazały obecność przeciwciał przeciwko WNV u wróbla domowych (*Passer domesticus*) oraz wróbla mazurków (*Passer montanus*). Wśród badanej populacji wróbla w Łomiankach na obrzeżach Puszczy Kampinoskiej odpowiednio 2,8% wróbla domowych oraz 12,1% wróbla mazurków wykazywało obecność przeciwciał przeciwko WNV [13].

W 2006 roku u 3 bocianów (*Ciconia ciconia*) i jednej wrony (*Corvus corone cornix*), pacjentów Ptasięgo Azylu w Warszawie, oraz u jednego młodego łabędzia niemego (*Cygnus olor*) w okolicach Sieradza stwierdzono w surowicy przeciwciała odpornościowe w kierunku WNV. Badania serologiczne 47 dzikich pta-

ków należących do 10 gatunków wykazały, że 10,6% było seropozytywnych [26].

W 2005 roku w Klinice Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku odnotowano obecność przeciwciał przeciwko WNV u 55 letniej kobiety. Kobieta trafiła do szpitala z objawami neurologicznymi oraz gorączką utrzymującą się od 2 tygodni. Zakażenie prawdopodobnie nastąpiło na terytorium Polski [8].

Zakład Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach przebadał 1664 ptaki dzikie pochodzące z terenów całej Polski. Wśród przebadanych ptaków znajdowały się: 696 kaczki dzikie (*Anas platyrhynchos*), 30 myszołówów (*Buteo buteo*), 395 kaczek krzyżówek (*Anas querquedula*), 12 wron (*Corvus corone cornix*), 62 łyski, (*Fulica atra*), 3 kruki (*Corvus corax*), 84 bażanty (*Phasianus colchicus*), 3 głuszce zwyczajne (*Tetrao urogallus*), 3 piecuszki (*Phylloscopus trochilus*), 12 jerzyków (*Apus apus*), 110 kuropatw (*Perdix perdix*), 5 bąków łąkowych (*Botaurus stellaris*), 13 rudzików (*Erithacus rubecula*), 5 zimorodków zwyczajnych (*Alcedo atthis*), 4 pierwiosnki (*Phylloscopus collybita*), 2 pokrzewki cierniówki (*Sylvia communis*), 1 muchołówka szara (*Muscicapa striata*), 2 grubodzioby (*Coccothraustes coccothraustes*), 2 muchołówki żałobne (*Ficedula hypoleuca*), 4 błotniki łąkowe (*Circus pygargus*), 1 pokrzywnica (*Prunella modularis immaturus*), 5 sokołów wierzowne (*Falco tinnunculus*), 1 sroka zwyczajna (*Pica pica*), 1 kukułka (*Cuculus canorus*), 1 słowik szary (*Luscinia luscinia*), 1 pustułka (*Falco tinnunculus*), 12 świstunek leśnych (*Phylloscopus sibilatrix*), 3 kawki (*Corvus monedula*), 108 sikor bogatek (*Parus major*), 4 wrony siwe (*Corvus cornix*), 2 zięby zwyczajne (*Fringilla coelebs*), 3 drozdy śpiewaki (*Turdus philomelos*), 2 strzyżyki zwyczajne (*Troglodytes troglodytes*), 2 mysikróliki zwyczajne (*Regulus regulus*), 1 wydrzyk tęposterny (*Stercorarius pomarinus*), 3 bociany (*Ciconia-ciconia*), 17 mew srebrzystych (*Larus argentatus*), 1 cierniówka (*Sylvia communis*) oraz 45 jastrzębi gołębiarzy (*Accipiter gentili*).

Badania próbek pochodzących od wymienionych powyżej ptaków dzikich prowadzone były opracowaną metodą własną NRT-PCR oraz komercyjnym zestawem West Nile Virus Kit Prodesse™. Wśród przebadanych ptaków dzikich nie stwierdzono obecności materiału genetycznego wirusa Zachodniego Nilu [23].

7. Podsumowanie informacji WNV

W dobie obecnych zagrożeń, jakie niesie ocieplenie klimatu stwarzające dogodne warunki bytowania komarów jak również stwierdzenie obecności przeciw-

ciał skierowanych przeciwko WNV, może sugerować, że groźny wirus jest już obecny na terenie naszego kraju. Może to doprowadzić w konsekwencji do powstania ogniska przyrodniczego w kraju. Jest zatem wyraźna przesłanka do doskonalenia metod ułatwiających diagnostykę i identyfikację WNV, a także badań monitoringowych na terenie Polski.

8. Gorączki krwotoczne

Wirusy odpowiedzialne za gorączki krwotoczne należą do czterech różnych rodzin *Arenaviridae*, *Bunyviridae*, *Filoviridae* i *Flaviviridae*. Są odpowiedzialne za powstanie ognisk epidemicznych na terenie Afryki, Azji i Ameryki Południowej, do Europy i USA mogą zostać zawleczone, gdyż pojawiają się u osób powracających z rejonów endemicznych [4].

Do rodziny *Flaviviridae* oprócz wirusa Zachodniego Nilu należy wirus denga, wywołujący u ludzi gorączkę krwotoczną, w trakcie której występują obok wysokiej gorączki, silne bóle, sztywność mięśni i stawów. Krwotoczna postać jest śmiertelna. Wirus jest przenoszony przez komary z gatunku *Aedes aegypti*. Chorobę zanotowano już w Azji, obu Amerykach, Afryce, łącznie w ponad 100 krajach strefy tropikalnej i subtropikalnej, a wirus coraz szybciej przesuwa się na północ [20].

Gorączka krymsko-kongijska wywołwana jest przez *Nairovirus* z rodziny *Bunyviridae*. Rezerwuarem i wektorem wirusa są kleszcze. Występowanie choroby potwierdzono w licznych krajach Azji, Afryki, a także Europy: w Rosji, Albanii, Bułgarii, Bośni i Hercegowinie. Ludzie zakażają się poprzez kleszcze, a także przez kontakt z krwią zakażonych zwierząt. Opisano też przypadki zakażeń szpitalnych oraz poprzez transfuzję krwi. Początkowe objawy choroby są nieswoiste, występują silne bóle głowy, stawów, mięśni, brzucha, wymioty i wysoka gorączka. W późniejszym okresie dochodzi do ciężkich krwotoków z nosa i uogólnionych krwawień z błon śluzowych. Śmiertelność wynosi od 9 do 50% u chorych hospitalizowanych [4].

Do *Filoviridae* należą wirusy Marburg i Ebola powodujące najcięższy przebieg choroby. Do zakażenia dochodzi na drodze pośredniego lub bezpośredniego kontaktu. Najwyższa śmiertelność, bo sięgająca nawet do 80%, jest obserwowana w wyniku zakażenia wirusem Ebola. Rezerwuarem są prawdopodobnie gryzoni i niektóre gatunki małp [18].

SARS czyli zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej jest wywołwany przez koronawirus (*SARS associated Coronavirus*), należący do rodziny *Coronaviridae*. Do rodziny tej należą wirusy występujące u zwierząt ssących, ptaków i ludzi. Rezerwuarem wirusa mogą być zarówno zwierzęta domowe takie jak

koty lub dzikie zwierzęta np. cywety. Jednakże pochodzenie i pierwotny rezerwuar wirusa nie jest do końca wyjaśniony. Zakażenie szerzy się drogą kropelkową podczas mówienia, kaszlu, kichania. Okres wylegania choroby wynosi około 5 dni. Choroba rozpoczyna się objawami grypopodobnymi, a następnie rozwija się atypowe zapalenie płuc. Śmiertelność dochodzi do 50%. Epidemia SARS trwała od 1.11.2002 r. do 30.07.2003 r. [22].

9. Podsumowanie

Dynamika i tempo przemian, ekspansywna działalność człowieka, masowy transport ptaków i ssaków może stanowić niebezpieczeństwo zawleczenia różnych chorób na terytorium Polski. Pojawianiu się nowych chorób sprzyja również zmniejszona odporność człowieka, starzenie się populacji, powstawanie dużych aglomeracji miejskich, zmiany klimatyczne i związane z tym klęski żywiołowe, migracje ludzi oraz masowa turystyka. Pełna świadomość tego faktu i obrona przed nowymi chorobami wymagają ścisłej współpracy służb medycznych, weterynaryjnych, ornitologów, entomologów, służb granicznych, by być przygotowanym na każdy możliwy scenariusz i podjąć właściwe kroki do walki z nowymi zagrożeniami.

Piśmiennictwo

- Campbell G.L., Marfin A.A., Lanciotti R.S., Grubler D.: West Nile virus. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 519–529 (2002)
- CDC Raport for 2009 West Nile Virus Activity in the United States – Reported to December 16 (2009)
- Ceinau C.S., Nicolaiescu G., Petrescu A., Ciulacu V., Savage H.M.: Avian serology for West Nile virus in surveillance in Southwestern Romania 1997–2000, Abstract Book of 3rd International Congress of Vector Ecology, Barcelona Spain, 23 (2001)
- Cleri D.J., Ricetti A.J., Porwancher R.B., Ramos-Bonner I.S., Vernaleo J.B.: Viral hemorrhagic fever current status of endemic disease and strategies for control. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **20**, 359–393 (2006)
- Diaz L.A., Komar N., Visintin A., Dantur M.J., Stein M., Allende R.L., Spinsanti L., Konigheim B., Aguilar A., Laurito M., Almirón W., Contigiani M.: West Nile Virus in Birds, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 689–691 (2008)
- Glavits R., Ferenczi E., Ivanics E., Bakonyi T., Mató T., Zarka P., Palya V.: Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary. *Avian Pathol.* **34**, 408–414 (2005)
- Gould L.H., Fikrig E.: West Nile virus: a growing concern. *J. Clin. Invest.* **113**, 1102–1107 (2004)
- Hermanowska-Szpakowicz T., Grygorczuk S., Kondrusik M., Zajkowska J., Pancewicz S.: Zakażenie wirusem zachodniego Nilu. *Przegl. Epidemiol.* **60**, 93–98 (2006)
- Hayes E.B., O’Leary D.R.: West Nile virus infection: a pediatric perspective. *Pediatrics*, **113**, 1375–1381 (2004)
- Huang C., Slater B., Rudd R., Parchuri N., Hull R., Dupuis M., Hindenburg H.: First isolation of West Nile virus from a patient with encephalitis in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1367–1371 (2002)
- Hubalek Z., Holouzka J.: West Nile fever – a reemerging mosquito-borne disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 643–650 (1999)
- Iwamoto M. i wsp.: Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *New Eng. J. Med.* **348**, 2196–2203 (2003)
- Juricova Z., Pinowski J., Literak I. i wsp.: Antibodies to alphavirus, flavivirus, and bunyavirus arboviruses in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*Passer montanus*) in Poland. *Avian Dis.* **42**, 182–185 (1998)
- Kilpatrick A.M., Meola M.A., Moudy R.M., Kramer L.D.: Temperature, Viral Genetics, and the Transmission of West Nile Virus by *Culex pipiens* Mosquitoes. *PLoS Pathogens*, **4**, 1–6 (2008)
- Klein C., Kimiagar I., Pollak L., Gandelman-Martón R. i wsp.: Neurological features of West Nile infection during the 2000 outbreak in a regional hospital in Israel. *J. Neurol. Sci.* **200**, 63–66 (2000)
- Lanciotti R.S., Ebel G.D., Deubel V., Kerst A.J., Murri S., Meyer R., Bowen M., McKinney N., Morrill W.E., Crabtree M.B., Kramer L.D., Roehring J.T.: Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, **298**, 96–105 (2002)
- Langevin S.A., Bunning M., Davis B., Komar N.: Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 726–729 (2001)
- Mahanty S., Bray M.: Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fever. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 487–498 (2004)
- Malkinson M., Banet C.: The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* **267**, 309–322 (2002)
- Marthy A.M., Jahrlig P.B., Geisbert T.W.: Viral haemorrhagic fever. *Clin. Lab. Med.* **26**, 345–386 (2006)
- Platonov A.E., Shipulin G.A., Shipulina O.Y., Tyutyunnik E.N., Frolochkina T.I., Lanciotti R.S., Yazyshina S., Platonova O.V., Obukhov I.L., Zhukov A.N., Vengerov Y.Y., Pokrovskii V.I.: Outbreak of West Nile Virus Infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 128–132 (2001)
- Poon L.I.M., Guan Y., Nicholls J.M., Yuen K.Y., Peiris J.S.M.: The etiology, origin, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 663–671 (2004)
- Samorek-Salamonowicz E., Niczyporuk J.S., Wijaszka T.: Wirus Zachodniego Nilu – zagrożenie dla zdrowia publicznego. *Medycyna Wet.* **64**, 1368–1370 (2008)
- Sampathkumar P.: West Nile Virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention. *Clinic. Proc.* **78**, 1137–1144 (2003)
- Smithburn J.S., Hughes T.P., Burke A.W., Paul J.H.: A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med.* **20**, 471–492 (1970)
- Wegner E., Hubalek Z.: Badania na przeciwciała przeciwko wirusowi Zachodniego Nilu u dzikich ptaków. X International Symposium of parasitic, allergic and poisonous arthropods – medical and sanitary importance, Kazimierz Dolny, 51, 2008
- Zeller H.G., Schuffenecker I.: West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in Americas. *Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 147–156 (2004)

Wykład przedstawiony na Konferencji naukowej „Mikrobiologia 100 lat po Robercie Kochu”
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Warszawie w dniach 30–31 sierpnia 2010 r.

Stanisława Tylewska-Wierzbanowska^{1*}, Tomasz Chmielewski¹

¹Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – PZH, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

1. Wstęp. 2. Kleszcze jako przenosiciele (wektor) zakażeń. 3. Borelioza z Lyme. 4. Anaplazmoza. 5. Tularemia. 6. Bartonelozy. 7. Zakażenia *Rickettsia* sp. 8. Zakażenia mieszane. 9. Podsumowanie

Tick-borne zoonoses occurring in Poland

Abstract: In Poland, there are several recognized tick-borne diseases such as Lyme borreliosis, granulocytic anaplasmosis, Q fever and bartonellosis, whose occurrence is frequent. Recently, spotted fever group rickettsiae have been found in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks. At the same time, antibodies to *Rickettsia slovaca* and *R. massiliae* have been detected in humans originating from this area. These diseases may cause serious health problems. Our preliminary data have shown that *B. burgdorferi*, *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii* are present in valves and myocardium of heart transplant recipients suggesting that infections with these bacteria could be the cause of heart failure.

1. Introduction. 2. Ticks as vectors of infection. 3. Lyme borreliosis. 4. Anaplasmosis. 5. Tularemia. 6. Bartonellosis. 7. *Rickettsia* spp. infections. 8. Co-infections. 9. Summary

Słowa kluczowe: zoonoza, zakażenie odkleszczowe, wektor, anaplazmoza granulocytarna, borelioza z Lyme, riketsje z grupy gorączek plamistych

Key words: zoonosis, tick-borne infection, vector, granulocytic anaplasmosis, Lyme borreliosis, spotted fever group rickettsiae

1. Wstęp

Styl życia współczesnych społeczeństw, aktywny wypoczynek, rozwój turystyki, sporty ekstremalne, chęć poznawania i zajmowania nowych, kiedyś nieosiągalnych terenów, niosą za sobą czasami ujemne skutki i są nowymi czynnikami zwiększonego ryzyka zachorowania.

Powszechnie stosowane zabiegi higieniczne są mało skuteczne w stosunku do drobnoustrojów wywołujących choroby przenoszone przez przenosiela (wektor), np. przez kleszcze. Wiele tych zakażeń występuje sezonowo, w okresie aktywności różnych gatunków pajęczaków. W naszej strefie klimatycznej, kleszcze mogą być wektorem przenoszącym zakażenia od wiosny do jesieni.

Jeżeli drobnoustroje chorobotwórcze zanim zostaną przekazane kolejnemu żywicielowi, w organizmie kleszcza namnażają się i zmieniają swoje właściwości antygenowe, a także mogą utrzymywać się w ustroju przenosiela przez kolejne jego stadia i pokolenia, to nazywamy go wektorem biologicznym, w odróżnieniu od przypadkowego, mechanicznego przeniesienia drobnoustrojów przez stawonoga, z jednego osobnika na drugiego [1].

2. Kleszcze jako przenosiciele zakażeń [1, 16]

Kleszcze są żywiącymi się krwią kręgowców pasożytami, o dużym znaczeniu dla medycyny ludzkiej i weterynaryjnej. Są one rezerwuarem i wektorem wielu chorobotwórczych dla człowieka wirusów, bakterii i pierwotniaków. Zakażenia przenoszone przez kleszcze mają znaczący udział w grupie chorób zakaźnych. Zasięg występowania tych chorób ściśle pokrywa się z obszarem występowania przenoszących je kleszczy.

W całej Europie, w tym także w Polsce, powszechnie spotykanym kleszczem jest *Ixodes ricinus* (kleszcz pospolity, kleszcz pastwiskowy). Występuje on na terenie całego kraju, na obszarach o średnim poziomie wilgotności, głównie w lasach mieszanych i liściastych, na ich obrzeżach oraz na łąkach w pobliżu lasów.

Większość dotychczas dokładnie zlokalizowanych i opisanych naturalnych jego siedlisk to obszary przejściowe między dwoma różnymi typami roślinności, jak np. brzegi lasów graniczące z łąkami, polany, błonia nad rzekami, i stawami, zagajniki z zaroślami, obszary gdzie las liściasty przechodzi w iglasty lub wysoki w niski, obszary zarośnięte paprociami, jeżynami, czarnym bzem i leszczyną. Są to ekotony,

* Autor korespondencyjny: ¹Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – PZH, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. (22) 5421250, e-mail: stylewska@pzh.gov.pl

tj. strefy przejściowe, na granicy dwóch (lub większej liczby) różnych biocenoz, np. biocenoza lasu i łąki. Zapewniają one optymalne warunki bytowania kleszczy i ich żywicieli, zamieszkują go bowiem organizmy charakterystyczne dla obu biocenoz oraz takie, które są swoiste tylko dla tej strefy. Obszary te charakteryzują się dużą bio-różnorodnością. Wilgotne lato i łagodna zima sprzyjają rozprzestrzenieniu się kleszczy. Atakują swoich potencjalnych żywicieli na łąkach i w lasach.

Kleszcze w swoim życiu przechodzą przeobrażenie. Ich cykl życiowy trwa zazwyczaj 2 lata. Rozpoczyna się latem, z chwilą wyklucia się z jaj larwy. Postać ta, o wymiarach ułamka milimetra i sześciu odnóżach (postać dorosła ma 4 pary) poszukuje żywiciela, który mógłby dostarczyć jej posiłku umożliwiającego dalszy rozwój i przeobrażenie się w postać nimfy. Postaci niedojrzałe kleszczy, larwy i nimfy spotyka się na trawie i w niskich krzakach. Niewidoczne wiszą na źdźbłach trawy i na spodzie liści. Postaci dorosłe występują przede wszystkim na krzewach, nawet na wysokości 3 metrów. Żywicielami larw i nimf są małe ssaki (owadożerne i gryzonie). Nimfy żerują także na większych ssakach, np. na jeleniach, sarnach, królikach i zającach, rzadziej na ptakach. Dorosłe osobniki pasożytują na bydle, owcach, kozach, łosiach, żubrach, jeleniach, sarnach, dzikach, lisach, zającach, psach, królikach i ptakach. Człowiek jest żywicielem przypadkowym każdej postaci rozwojowej. Długość ciała głodnego kleszcza waha się od jednego do kilku milimetrów. Podczas ssania krwi następuje charakterystyczny, kilkakrotny wzrost wielkości ich ciała.

W poszukiwaniu potencjalnego żywiciela kleszcze reagują na różne pochodzące od niego, czynniki stymulujące. Może to być np. wzrost stężenia dwutlenku węgla, wibracje, dotyk, zapach, promieniowanie ciepłe. Zależnie od gatunku kleszcza, poszukujący żywiciela osobnik może polować aktywnie przesuując się w kierunku wyczuwanych stymulatorów lub czekać biernie na przypadkowe zbliżenie.

Kleszcz pospolity (*Ixodes ricinus*) należy do kleszczy trójżywicielowych, którego każde stadium rozwojowe (larwa, nimfa i samica) ssie krew innego żywiciela, jeden raz przed przekształceniem się w następną postać, w przypadku larwy i nimfy lub w przypadku samicy przed złożeniem jaj. Posiłki te warunkują przeobrażenie się w kolejne stadium i złożenie jaj. Każde stadium rozwojowe kleszcza, tzn. larwa, nimfa i imago (postać dojrzała) musi raz wyssać krew kręgowca, aby móc się dalej rozwijać. Bez jedzenia mogą żyć do dwóch lat. Samce nie pobierają krwi. Żywicielami mogą być niemal wszystkie gatunki lądowych kręgowców, w tym człowiek. Cykl rozwojowy kleszcza *I. ricinus* trwa w naszej strefie klimatycznej kilka lat (około 3 lat lub dłużej), zależnie od warunków środowiskowych.

Kleszcze charakteryzuje sezonowa aktywność, która zależy od warunków klimatycznych. Dojrzałe postaci są aktywne już w temperaturze 5°C, zaś nimfy w temperaturze 8°C. Larwy atakują żywicieli od maja do września, najczęściej w czerwcu, lipcu i sierpniu.

Wzrost temperatury powoduje wzrost aktywności kleszczy, która w Europie Środkowej rozpoczyna się na przełomie marca i kwietnia i trwa do października/listopada. Maksimum aktywności zależy od czynników klimatycznych i przebiega w dwóch fazach, w maju/czerwcu i we wrześniu/październiku. W Polsce rozpoczyna się od połowy kwietnia (czasem wcześniej, nawet w marcu) i trwa do początku listopada, z dwoma szczytami – pierwszym od maja do połowy czerwca, drugim we wrześniu.

Kleszcze podlegają działaniu różnorodnych, zewnętrznych czynników środowiskowych, z których najbardziej znaczące są temperatura, wilgotność, światło, promieniowanie, a także działania człowieka.

Cykl rozwojowy kleszcza, a szczególnie jego rozwój, uwarunkowane są czynnikami środowiska, panującymi w najbliższym otoczeniu, przy czym znaczącą rolę odgrywa dostępność pokarmu. Ilość pobranej krwi, jakoś posiłku mają wpływ na płodność samic. Żerowanie na nietypowym żywicielu zmniejsza objętość posiłku powodując jednocześnie zmniejszenie pobudzenia oogenezy i liczby złożonych jaj. Dokładna analiza statystyczna zapadalności na TBE (kleszczowe zapalenie mózgu) w Polsce i warunków pogodowych panujących w tym czasie wykazała istnienie zależności pomiędzy temperaturą otoczenia a liczbą zakażeń. Im wyższe w danym sezonie temperatury tym większa liczba zarejestrowanych przypadków TBE [28, 29].

W Polsce, największe znaczenie medyczne i weterynaryjne obok kleszcza *Ixodes ricinus*, mają: *Argas reflexus* (obrzeżek gołębi) i *Dermacentor reticulatus* (kleszcz łąkowy). Na terenie całego kraju kleszcze te mogą być przenosicielami: boreliozy z Lyme, anaplazmozy, kleszczowego zapalenia mózgu, tularemi gorączki Q, a także prawdopodobnie bartonelizy i riketsjozy z grupy gorączek płamistych. Wieloletnie badania i obserwacje wskazują na endemiczne występowanie w Polsce takich chorób jak borelioza z Lyme, kleszczowe zapalenie mózgu, gorączka Q, także takich, których rozpowszechnienie nie jest dobrze poznane i nie jest monitorowane jak np. anaplazmoza, babesioza czy bartonelozy.

3. Borelioza z Lyme [14, 15, 20, 25]

Jest to najczęstsza na półkuli północnej choroba przenoszona przez kleszcze. Według szacunkowych danych i ocen przeprowadzonych przez Światową Organizację Zdrowia cała Europa spełnia kryteria terenu endemicznego boreliozy z Lyme.

Czynnikiem etiologicznym boreliozy z Lyme są krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Gatunek ten podzielony został na ponad 20 genogatunków (genotypów), z których *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garini* i *B. afzeli* oraz ostatnio poznane nowe genogatunki *Borrelia bissetti* i *B. spielmani* są chorobotwórcze dla człowieka.

Głównym, mającym podstawowe znaczenie w szerzeniu się zakażenia rezerwuarem *B. burgdorferi* są drobne gryzonie. Ponadto krętki te stwierdzano u zajęcy, jeży, zwierzyny płowej (sarny, jelenie, daniele), u ptaków wróblowatych, bażantów, mew, kormoranów, a także jaszczurek. Prawdopodobnie każdy żywiciel kleszcza może być rezerwuarem tych bakterii. Badania rezerwuaru krętków *B. burgdorferi* nie wykazały ich powinowactwa do wybranych gatunków gospodarza. Są one wykrywane u wszystkich rodzajów i gatunków kręgowców lądowych, będących żywicielami kleszczy. Kleszcze *Ixodes* sp. które pełnią rolę przenosiela, stanowią również rezerwuar krętków. W Polsce stwierdza się te krętki przede wszystkim u drobnych gryzoni ale także u jeleni, koni i psów [5, 6].

Do zakażenia dochodzi w wyniku kontaktu z zakażonym kleszczem (wektor). Wektorem są różne gatunki kleszczy z rodzaju *Ixodes*. W Europie i w Polsce jest to *I. ricinus*.

Zasięg terytorialny boreliozy z Lyme obejmuje obszar całej Polski. Badania prowadzone w wielu ośrodkach, obejmujące tysiące kleszczy zebranych na terenie wielu województw wskazują, że rozpowszechnienie zakażonych krętkami *Borrelia burgdorferi* kleszczy waha się od 6 do 15% i dotyczy w równym stopniu terenów wiejskich jak i miejskich (parki i skwery).

Borelioza z Lyme jest wieloukładową chorobą zakaźną. W początkowej fazie choroby charakterystyczne są zmiany skórne (rumień wędrujący). Po kilku tygodniach rumień wędrujący może ustąpić samoistnie, ale zakażenie rozprzestrzenia się na wiele układów i narządów. Mogą występować objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego (neuroborelioza), ze strony narządu ruchu (borelioza stawowa) oraz ze strony układu krążenia w postaci zaburzeń rytmu serca, łącznie z blokiem przedsionkowo-komorowym. Rocznie w Polsce rejestrowanych jest około 8–9 tysięcy przypadków, a zapadalność na boreliozę z Lyme wynosi ponad 20 zachorowań na 100 tysięcy mieszkańców [10, 14].

4. Anaplazmoza granulocytarna [2, 8, 19]

Anaplazmoza wywoływana jest przez bakterie *Anaplasma phagocytophilum*, bezwzględnie pasożyta wewnątrzkomórkowego krwinek białych. Nie jest objęta w Polsce nadzorem epidemiologicznym

i w związku z tym trudno jest ocenić częstość jej występowania.

Przez lata bakterie te znane były jako czynnik etiologiczny chorób zwierząt hodowlanych. Pierwsze przypadki zachorowań u ludzi opisano w 1996 r. jako erlichiozę granulocytarną wywołaną przez czynnik HGE (Human granulocytic ehrlichiosis agent), przenoszona przez kleszcze rodzaju *Ixodes* sp. Izolacja czynnika etiologicznego, a następnie charakterystyka wyizolowanych szczepów i DNA tych bakterii zdecydowała o włączeniu czynnika HGE do rodzaju *Anaplasma* jako nowy gatunek *A. phagocytophilum*.

Rezerwuarem drobnoustroju są dzikie zwierzęta, głównie drobne gryzonie. Drobnoustrój wnika przez skórę podczas ukłucia przez zakażonego kleszcza.

Występuje w różnych krajach i na różnych kontynentach. Zasięg występowania anaplazmozy granulocytowej pokrywa się z zasięgiem występowania kleszczy rodzaju *Ixodes*. Przypadki anaplazmozy granulocytowej wykrywane są w północnych stanach USA, w Szwecji, Polsce, Słowenii i Rosji.

Pierwszy przypadek anaplazmozy w Polsce opisano w 2001 roku. Było to zakażenie mieszane. Początkowo rozpoznano u chorego boreliozę z Lyme, w przebiegu której stwierdzono nietypowe dla tego zakażenia objawy hematologiczne. Choroba miała ciężki, zagrażający życiu przebieg.

Zwykle anaplazmoza rozpoczyna się nagle wysoką gorączką, której towarzyszą bóle mięśni, ogólne osłabienie i złe samopoczucie. Objawy te pojawiają się po około 3 tygodniach od kontaktu z kleszczem. Zakażenie może przebiegać z różnym nasileniem, od przypadków bezobjawowych do ciężkich, kończących się śmiercią. Mało charakterystyczne objawy kliniczne stwarzają trudności w prawidłowym ukierunkowaniu badań diagnostycznych. Najczęściej obserwuje się objawy grypopodobne, takie jak wysoka gorączka, bóle mięśni, stawów, osłabienie, bóle i zawroty głowy, wymioty, biegunkę, a także powiększenie wątroby i śledziony. U części chorych może wystąpić zapalenie płuc z zaburzeniami oddychania, niewydolność nerek oraz objawy neurologiczne z zaburzeniami świadomości. W najcięższych postaciach obserwuje się spadek ciśnienia krwi, zaburzenia oddychania, ostrą niewydolność nerek, krwawienia z przewodu pokarmowego, zapalenie mózgu i opon mózgowych, powikłane ciężkimi zakażeniami oportunistycznymi. Z zajęcie ośrodkowego układu nerwowego może objawiać się zaburzeniami świadomości, atakami padaczkowymi, śpiączką. Śmiertelność waha się w granicach 2–10%. Ponieważ w anaplazmozie granulocytowej bakterie pasożytują w granulocytach, u chorych występuje leukopenia, trombocytopenia, podwyższone stężenie kreatyniny i wzrost aktywności aminotransferaz w surowicy krwi.

5. Tularemia [14]

Do zakażenia najczęściej dochodzi przez bezpośredni kontakt z zakażonymi gryzoniami, lub ich wydaliniami, jednak wektorem tego zakażenia mogą być także kleszcze. Na zakażenie to narażeni są głównie myśliwi oraz ich rodziny. Tularemia charakteryzuje się wielopostaciowością form. Początek choroby jest zwykle nagły z gorączką, dreszczami, bólami głowy i mięśni, wymiotami i zapaleniem spojówek. W dalszym przebiegu choroby najczęściej występują kraterowate owrzodzenia w miejscu wnikięcia tych bakterii. Dochodzi do zajęcia okolicznych węzłów chłonnych, ich ropienia i wytworzenia się przetok. W postaci anginowej obserwuje się szaro-biały nalot a także owrzodzenia jamy ustnej. Najcięższy przebieg ma postać płucna ze śródmiąższowym zapaleniem płuc oraz postać trzewna, w wyniku której może dochodzić do perforacji jelit. Ze względu na objawy kliniczne tularemie nazywa się czasem “dumą gryzoni”.

6. Bartonelozy [3, 7, 12, 18, 21, 22, 24]

Zakażenia wywołane przez bakterie z rodzaju *Bartonella* stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka i zaliczane są do grupy „emerging/re-emerging diseases”. Przykładem są choroby wywołane przez *Bartonella quintana*, dawniej czynnik etiologiczny przenoszony przez wszy gorączki okopowej oraz nowo opisane gatunki rodzaju *Bartonella*, jak *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*. Z 19 dotychczas opisanych gatunków rodzaju *Bartonella*, ponad 10 jest związanych z zachorowaniami u ludzi.

Gorączka okopowa nazywana również gorączką wołyńską, gorączką pięciodniową, występowała na początku dwudziestego wieku, w czasie I wojny światowej. Była chorobą szerzącą się epidemicznie w okopach, szczególnie na wschodnim froncie. Miała charakterystyczny przebieg, ponieważ co pięć dni występował gwałtowny wzrost temperatury ciała z utratą świadomości, będąca wynikiem zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. Czynnikiem etiologicznym była *Rochalimea quintana*, obecnie nazywana *Bartonella quintana*. W czasie II wojny światowej gorączka okopowa prawie już nie występowała, po wojnie, w późniejszych latach, nie stwierdzano jej występowania, ani w Zachodniej Europie ani w Polsce. Na początku lat osiemdziesiątych uważano, że jest to „historyczna choroba”, współcześnie już niewystępująca. Tak było do drugiej połowy lat osiemdziesiątych. Wtedy nagle zaczęto stwierdzać u pojedynczych ludzi zapalenie wsierdza, gorączkę, zapalenie węzłów chłonnych o nieznanym etiologii, najpierw w Ameryce, potem we Francji i w całej Europie. Po wyizolowaniu bakterii okazało się, że jest to, ta sama bakteria, która wywoły-

wała gorączkę okopową. Intensywne badania doprowadziły do wykrycia i opisanego kilkunastu, nowych gatunków rodzaju *Bartonella*.

Stwierdzano je początkowo u chorych na AIDS jako zakażenia oportunistyczne. Zarówno w USA jak i w Europie wykazano, że u chorych na AIDS *B. quintana* może być przyczyną wielu schorzeń. W następnych latach zakażenia te wykryto także u ludzi wolnych od zakażenia wirusem HIV. W 1989 roku stwierdzono, że czynnikiem etiologicznym tych zakażeń może być również inny, nowy gatunek bakterii z tego rodzaju – *B. henselae*. Obecnie wiadomo, że zakażenia różnymi gatunkami bakterii z rodzaju *Bartonella* mogą występować w różnych postaciach zarówno u chorych na AIDS, u chorych z obniżoną odpornością, z chorobami wyniszczającymi, u biorców przeszczepów jak również u ludzi ze sprawnym układem immunologicznym. Rezerwuarem *B. henselae* są koty, z których jak przypuszcza się zakażenie przenoszone jest przez pchły. Obecnie wektor *B. quintana* jest nieznany, zakażenia występują również w środowisku wolnym od wszy. Ponadto, przebieg tego zakażenia jest inny niż gorączki okopowej. Zakażenie nie szerzy się epidemicznie i nie występują pięciodniowe okresy gorączki. Nie jest to choroba przenoszona wyłącznie przez wszy, prawdopodobnie mogą przenosić ją pchły, a także kleszcze. Zakażenie manifestuje się różnymi objawami.

Bartonelozy mogą być przyczyną zapalenia wsierdza, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia płuc, naczyńkowości, płamicy wątrobowej, zapalenia gałki ocznej, choroby kociego pazura i innych.

Najłagodniejszą postacią bartonelozy jest choroba kociego pazura. Jest tak nazywana, ponieważ najczęściej do zakażenia dochodzi w wyniku zadrapania, ugryzienia lub poślinienia przez kota. Badania wykazały, że w Polsce ponad 50% kotów jest zakażonych. Choroba kociego pazura objawia się zwykle powiększeniem jednego węzła chłonnego położonego blisko miejsca zadrapania lub pogryzienia przez kota. Może przebiegać jako ostre, podostre lub przewlekłe zapalenie jednego lub kilku węzłów chłonnych.

Inne, rzadziej spotykane objawy to zapalenie mózgu, zapalenie płuc, zapalenie kości, *erythema nodosum*.

Jednak jak wskazują dane z całego świata bakterie z rodzaju *Bartonella* mogą atakować wiele układów i narządów. Objawy kliniczne zakażenia są bardzo zróżnicowane. Wspólną cechą wszystkich zachorowań jest bakteriemia, której w większości przypadków towarzyszy gorączka. U niektórych chorych z bakteriemią może dojść do zapalenia wsierdza. W tych przypadkach konieczna jest zwykle wymiana zastawek. Poszukując przyczyn gorączki o nieznanym etiologii (wszystkie gatunki rodzaju *Bartonella*) lub czynnika etiologicznego zapalenia wsierdza (*B. vinsonii* sub. *berkhoffii*, *B. koehlerae*, *B. elizabethae*, *B. washoensis*) należy brać pod uwagę zakażenie tymi bakteriami. Inna po-

stać zakażenia, *bacillary angiomatosis*: choroba rozrostowa naczyń, najczęściej dotyczy skóry, może obejmować warstwy powierzchniowe naskórka, skóry lub podskórne. Zmiany te mogą występować również na błonach śluzowych jamy ustnej, odbytu lub całego przewodu pokarmowego. *Pelosis hepatitis* wywołana przez *Bartonella* sp. wykrywana jest u ludzi zażywających steroidy anaboliczne, z zaawansowaną chorobą nowotworową lub innymi chorobami wyniszczającymi, jak gruźlica i zakażenie HIV. Wspólną cechą chorych jest przebywanie w bardzo złych warunkach sanitarnych, niedożywienie, alkoholizm. Najczęściej dotyczy bezdomnych.

Bartoneloza jest to zoonoza nabywana przez człowieka od towarzyszących mu zwierząt. W województwie mazowieckim, w okolicach Warszawy zbadano dużą grupę kotów i psów oraz ich ektopasożyty, w kierunku obecności zakażeń *Bartonella* sp. Wykryto, że ponad 50% kotów jest zakażonych tymi bakteriami. Przy czym przebiega ono bezobjawowo. Jednocześnie, nie stwierdzono tych bakterii w zebranych ze zwierząt pchłach natomiast obecne były one w zdjętych z psów kleszczach. Jednocześnie u psów, na których żerowały zakażone kleszcze, wykryto w surowicy krwi swoiste przeciwciała.

Chociaż nie jest udowodniona droga przenoszenia zakażenia *Bartonella* sp. przez kleszcze ale istnieje wiele badań wykazujących w nich obecność tych bakterii oraz u zwierząt i ludzi, na których te stawonogi żerowały. Badano także różne populacje ludzi, potencjalnie narażonych na zakażenie *Bartonella* sp., jak np.: lekarze weterynarii, właściciele kotów, bezdomni alkoholicy i narkomani. Wszyscy oni należą do grupy zwiększonego ryzyka zachorowania ze względu na częsty, bliski kontakt ze zwierzętami bądź specyficzne obyczaje i tryb życia. Stwierdzono znamienne podwyższone poziomy przeciwciał dla *B. henselae* i *B. quintana* u wszystkich badanych oprócz grupy narkomanów. Ponadto z krwi niektórych badanych, niewykazujących żadnych objawów zakażenia, izolowano szczepy *B. henselae*.

7. Gorączka Q [8, 23, 27]

Jest to typowa odzwierzęca choroba zakaźna wywołana przez *Coxiella burnetii*. Bakterie te są bezwzględnie pasożytami wewnątrzkomórkowymi, wywołującymi zakażenia, w przeniesieniu których mogą uczestniczyć kleszcze.

Drobnoustrój ten cechuje duża zakaźność; uważa się że 10–100 komórek bakteryjnych może wywołać zakażenie i ostrą chorobę. Mimo, że jest to pasożyt wewnątrzkomórkowy może przetrwać w środowisku zewnętrznym, w stosunkowo wysokich temperaturach (ginie dopiero po 15 sekundach w 74°C) jak również

odporny jest na wysuszenie i wiele substancji chemicznych, stosowanych jako środki dezynfekcyjne. Właściwości te związane są z wytwarzaniem form przetrwalnych.

Rezerwuarem *C. burnetii* w przyrodzie są różne dzikie zwierzęta, drobne gryzonie, króliki, dziki, sarny, jelenie. Stwierdzano również obecność tych bakterii u jaszczurek. W środowisku człowieka głównym rezerwuarem jest bydło, kozy i owce. W Polsce zakażenia ludzi najczęściej pochodzą od zakażonego bydła. Rzadko rejestrowane są zakażenia owiec. Wśród dzikich zwierząt *C. burnetii* izolowane były przede wszystkim z kleszczy i drobnych gryzoni, ale także wykryto je u żubrów.

Zwierzęta przechodzą zwykle zakażenie bezobjawowo, ale wydają bakterie z moczem, w mleku, a podczas porodów z wodami płodowymi. Człowiek zakaża się wdychając zakażony aerozol lub zakażony kurz, bez udziału kleszczy. Ponieważ głównym rezerwuarem *C. burnetii* w najbliższym otoczeniu człowieka jest bydło, owce i kozy, do grupy zwiększonego ryzyka zachorowania należą hodowcy tych zwierząt, służby weterynaryjne, a także pracownicy rzeźni i garbarni.

Rola kleszczy w krążeniu drobnoustroju jest niejednoznaczna. Drobnoustrój ten nie wykazuje powinowactwa do określonego rezerwuaru lub wektora. Bakterie *C. burnetii* stwierdzano w różnych gatunkach kleszczy. Z jednej strony uważa się, że kleszcze są wektorem przenoszącym zakażenie wśród dzikich zwierząt, z drugiej strony wiadomo, że zakażony kleszcz wydała dużą liczbę bakterii z kałem, który pozostając na sierści ssaków jest głównym źródłem zakażenia. Obecnie wielu badaczy uważa, że kleszcze są przede wszystkim rezerwuarem *C. burnetii*, a przeniesienie zakażenia nie wymaga wektora.

W fazie ostrego zakażenia gorączka Q przebiega zwykle pod postacią choroby gorączkowej ze znacznie podwyższoną temperaturą ciała (do 40°C), bólami głowy oraz występowaniem mało charakterystycznych objawów grypopodobnych i atypowego zapalenia płuc. Postać przewlekła występuje często jako powikłanie bezobjawowo przebytej gorączki Q i może powodować odległe objawy kliniczne w postaci m.in.: zatorowości płuc, zaburzeń zakrzepowo-zatorowych, zapalenia mięśnia serca i najczęściej zapalenia wsierdzia.

Mimo, że gorączka Q podlega nadzorowi epidemiologicznemu liczba rejestrowanych przypadków nie oddaje rzeczywistej liczby zachorowań.

8. Zakażenia *Rickettsia* sp. z grupy gorączek plamistych [4, 9, 13, 19]

Po raz pierwszy, obecność *Rickettsia conori* w kleszczu *I. ricinus* wykryto w Belgii w 1993 roku. Wtedy uważano, że jest to przypadkowe zakażenie i kleszcze

tego gatunku nie są zdolne do przeniesienia zakażenia z jednego żywiciela na drugiego, między innymi z powodu nieodpowiednich dla szerzenia się gorączki plamistej warunków klimatycznych. Badania kleszczy jako rezerwuaru i wektora bakterii z rodzaju *Rickettsia*, przeprowadzone w latach 2006–2009 na terenie kilku województw w Polsce, wykazały występowanie riketsji z grupy gorączek plamistych w kleszczach gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Pierwszy z wymienionych kleszczy występuje w całej Polsce, drugi w północno-wschodniej części kraju. Na terenie całej Polski wykryto obecność *Rickettsia raoultii* w kleszczach obu gatunków. DNA tych bakterii stwierdzono w 56.7% kleszczy *Dermacentor reticulatus* i 18.2% *Ixodes ricinus*. W kleszczach *I. ricinus* wykryto *Rickettsia slovaca* i *R. helvetica*, których jak przyjmowano do niedawna, granica występowania na północy przebiega, przez teren Słowacji i Czech.

W tych samych rejonach, z których pochodziły zakażone kleszcze u prawie 15% pracowników leśnych występowały przeciwciała swoiste dla riketsji z grupy gorączek plamistych, w tym dla *R. massiliae* i prawdopodobnie dla *R. slovaca*.

9. Zakażenia mieszane (ko-infekcje) [9, 17]

Istotnym problemem związanym z zakażeniami przenoszonymi przez kleszcze jest obecność kilku drobnoustrojów w organizmie jednego kleszcza. Patogeny, które powodują boreliozę z Lyme, anaplazmozę, bartonelozę często współistnieją w kleszczu, wywołując zakażenia mieszane. Wydaje się, że zależnie od rejonu, ryzyko takiego zakażenia jest różne ale jak dotychczas brak jest dokładnych danych. Wydaje się że podwójne zakażenia kleszczy najczęściej występują w rejonie Ameryki Płn i Europy. Ponieważ borelioza z Lyme na tych terenach jest chorobą endemiczną zwykle ko-infekcja dotyczy boreliozy i towarzyszącej jej drugiej infekcji. Według wielu autorów najczęściej występuje borelioza z Lyme i anaplazmoza. Rzadziej rozpoznawane są jednoczesne zakażenia trzema patogenami, w tym bakteryjno-wirusowymi lub pierwotniakowymi. Wykazano występowanie u ludzi zakażeń *B. burgdorferi*, wirusem TBE i *A. phagocytophila* lub *B. burgdorferi* i *Bartonella henselae*. Rozpoznanie zakażenia mieszanego ma nie tylko znaczenie epidemiologiczne ale przede wszystkim warunkuje wprowadzenie prawidłowego leczenia obejmującego swym spektrum wszystkie chorobotwórcze drobnoustroje.

Badania ostatnich lat wykazały, że wiele chorób odzwierzęcych przenoszonych przez kleszcze może prowadzić do powikłań w postaci uszkodzenia serca – zastawek lub mięśnia sercowego. Należą do nich borelioza z Lyme, bartonelozy, gorączka Q. Wymienione choroby należą do grupy tzw. nowo pojawiających

się i nawracających zagrożeń (emerging/re-emerging diseases) i stanowią jeden z ważniejszych problemów zdrowia publicznego. Wśród nich borelioza z Lyme jest najczęściej występującą na półkuli północnej i w Polsce, chorobą przenoszoną przez kleszcze, gorączka Q występuje w Polsce od 1956 roku jednak jej późne, przewlekłe postaci nie są rozpoznawane, bartoneloza diagnozowana jest od kilku lat ale klinicznie rozpoznawana jest głównie choroba kociego pazura wywołana przez *Bartonella henselae*, która jest jednym z kilku gatunków tego rodzaju odpowiedzialnym za zapalenie wsierdzia i mięśnia sercowego.

Przeprowadzone w ostatnich miesiącach w Samodzielnej Pracowni Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych NIZP-PZH serc biorców poddanych transplantacji serca, wykazały obecność u około 17% badanych obecność *Borrelia afzeli* i *Bartonella* sp. w zastawkach aortalnych i mitralnych oraz *Coxiella burnetii* w zastawce mitralnej oraz mięśniu sercowym. Stwierdzano także w sercu jednocześnie *Coxiella burnetii* i *Bartonella*.

10. Podsumowanie

Zmieniający się styl życia, aktywny wypoczynek, rozwój turystyki, sporty ekstremalne są czasami nowymi czynnikami zwiększonego ryzyka zachorowania. Przebywając na terenach rekreacyjnych człowiek narażony jest na kontakt z kleszczami i zakażenie przenoszonymi przez nie chorobami. Na terenie całego kraju kleszcze mogą być przenosicielem (wektorem) boreliozy z Lyme, anaplazmozy, kleszczowego zapalenia mózgu, tularemii, gorączki Q, a także prawdopodobnie bartoneloz i riketsjoz z grupy gorączek plamistych. Terytorium Polski można uznać za teren endemiczny boreliozy z Lyme, kleszczowego zapalenia mózgu i gorączki Q. Wykrycie nowych czynników etiologicznych zakażeń przenoszonych przez kleszcze z jednej strony można tłumaczyć znacznie czulszymi, nowoczesnymi metodami diagnostycznymi ale przede wszystkim należy zwrócić uwagę czynniki zmieniającego się środowiska (np. ocieplenie klimatu) czy zmienność samych drobnoustrojów (np. *Bartonella quintana* jako czynnik etiologiczny choroby występującej na początku XX wieku i obecnie)

Piśmiennictwo

1. Buczek A., Magdon T.: Host location by ticks (Acari: Ixodida). *Wiad. Parazyto.* **45**, 3–12 (1999)
2. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Riketsjozy i ich leczenie. *Nowa Klinika*, **11**, 753–755 (2004)
3. Chmielewski T., Podsiadły E., Tylewska-Wierzbanowska S.: Presence of Bartonella spp. in various human populations. *Polish J. Microbiol.* **56**, 33–38 (2007)

4. Chmielewski T., Podsiadły E., Karbowski G., Tylewska-Wierzbanowska S.: Rickettsia spp. In Ticks, Poland. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 486–488 (2009)
5. Humiczewska M.: Seasonal activity of the ticks *Ixodes ricinus* in the lakesides and forest habitats of Szczecin and environs and its infestation with the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Wiad. Parazytol.* **47**, 389–393 (2001)
6. Kiewra D., Lonc E.: Biology of *Ixodes ricinus* (L.) and its pathogens in Wrocław area. *Wiad. Parazytol.* **50**, 259–264 (2004)
7. Parola P., Davoust B., Raoult D.: Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res.* **36**, 469–492 (2005)
8. Parola P., Paddock C.D., Raoult D.: Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 719–756 (2005)
9. Podsiadły E., Chmielewski T., Karbowski G., Kędra E., Tylewska-Wierzbanowska S.: The occurrence of spotted rickettsioses and other tick-borne infections in forest workers in Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* (in press)
10. Podsiadły E., Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* infections of central nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **990**, 404–407 (2003)
11. Podsiadły E., Karbowski G., Tylewska-Wierzbanowska S.: Presence of *Bartonella* spp. In Ixodidae ticks. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 120–121 (2009)
12. Podsiadły E., Sokołowska E., Tylewska-Wierzbanowska S.: Seroprevalence of *Bartonella quintana* infections in Poland 1998–2001. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **990**, 407–409 (2003)
13. Stańczak J.: Detection of spotted fever group (SFG) rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in Poland. *Int. Med. Microbiol.* **40**, suppl., 144–148 (2006)
14. Stefanoff P., Rosińska M., Zieliński A.: Epidemiologia chorób przenoszonych przez kleszcze w Polsce. *Przegl. Epidemiol.* **60**, 151–159 (2006)
15. Strzelczyk J.K., Wiczowski A., Spausta G., Ciarkowska J., Zalewska-Ziob M., Izdebska-Starszak G., Strzelczyk J., Kasperczyk J.: Presence of spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks in the recreational area of Tarnowskie Góry and Zabrze districts in 2001–2003. *Przegl. Epidemiol.* **60**, 589–595 (2006)
16. Siuda K.: *Kleszcze (Acari: Ixodida)* Polski. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1991
17. Swanson S.J., Neitzel D., Reed K.D., Belongia E.A.: Coinfections acquired from Ixodes ticks. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 708–729 (2006)
18. Tylewska-Wierzbanowska S.: Choroba kociego pazura, w: Zapobieganie i zwalczanie chorób zakaźnych i pasożytniczych. Red. W. Magdzik. Vesalius – Uniw. Wyd. Medyczne, Kraków 1993, str. 72–74
19. Tylewska-Wierzbanowska S.: Riketsjozy. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. Red.: W. Magdzik, D. Naruszewicz-Lesiuk, A. Zieliński. α -medica press, Bielsko-Biała 2004, str. 230–236
20. Tylewska-Wierzbanowska S.: Borelioza z Lyme – rozpoznawanie i leczenie. *Nowa Klinika*, **12**, 13124–13128 (2005)
21. Tylewska-Wierzbanowska S.: Bartonelozy – nowe zagrożenie dla zdrowia człowieka. *Nowa Klinika*, **11**, 750–752, (2004)
22. Tylewska-Wierzbanowska S., Podsiadły E.: Seroepidemiology of bartonellosis in Poland; w: Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millennium. Ed.: D. Raoult and P. Brouqui. Elsevier, Paris 1999
23. Tylewska-Wierzbanowska S. Gorączka Q. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. Red.: W. Magdzik, D. Naruszewicz-Lesiuk, A. Zieliński. α -medica press, Bielsko-Biała 2004, str. 105–107
24. Tylewska-Wierzbanowska S.: Choroba kociego pazura, w: Zapobieganie i zwalczanie chorób zakaźnych i pasożytniczych. Red. W. Magdzik. Vesalius – Uniw. Wyd. Medyczne, Kraków 1993, str. 72–74
25. Tylewska-Wierzbanowska S.: Borelioza z Lyme – rozpoznawanie i leczenie. *Nowa Klinika*, **12**, 13124–13128 (2005)
26. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., Kondrusik M., Hermanowska-Szpakowicz T., Sawicki W., Sułek K.: First cases of acute Human Granulocytic Ehrlichiosis in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 196–198 (2001)
27. Tylewska-Wierzbanowska S. Gorączka Q. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. Red.: W. Magdzik, D. Naruszewicz-Lesiuk, A. Zieliński. α -medica press, Bielsko-Biała 2004, str. 105–107
28. Zajkowska J., Kondrusik M., Zajkowska O., Kuśmierczyk J., Czupryna P., Pancewicz S.: Statistical analysis of influence of meteorological data on the incidence rate of tick-borne encephalitis in Białystok. *Przegl. Epidemiol.* **62**, 453–460 (2008)
29. Zajkowska J., Malzahn E., Kondrusik M., Grygorczuk S., Pancewicz S.S., Kuśmierczyk J., Czupryna P., Hermanowska-Szpakowicz T.: *Przegl. Epidemiol.* **60**, suppl. 1, 186–189 (2006)

*Wykład przedstawiony na Konferencji naukowej „Mikrobiologia 100 lat po Robertcie Kochu”
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Warszawie w dniach 30–31 sierpnia 2010 r.*

Andrea Lipińska^{1*}, Krystyna Bieńkowska-Szewczyk¹

Katedra Wirusologii Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

1. Wstęp. 2. Szczepionki przeciw wirusowi ospy wietrznej i półpaśca. 3. Badania nad szczepionkami przeciw wirusom HSV, ludzkiemu cytomegalowirusowi i wirusowi Epsteina-Barr. 4. Wektory herpeswirusowe w terapii człowieka. 5. Podsumowanie

Novel antiherpesviral vaccines and herpesviral vectors for human therapy

Abstract: Herpesviruses constitute one of the largest viral families, which encompasses viral infectious agents widely occurring in the human population. The use of antiviral therapeutics usually does not prevent herpesvirus recurrences and has not lead to the virus eradication. This may be achieved with antiviral vaccines. Despite a long track of vaccine clinical trials and numerous strategies of research, commercial vaccines are available only for one herpesvirus – varicella-zoster virus (VZV). In addition to the varicella vaccine, a therapeutic vaccine to prevent herpes zoster in elderly people has been recently introduced. This paper reviews the most recent developments in human herpesvirus vaccines, both prophylactic and therapeutic. The most promising clinical trials, which may lead to successful vaccines in the near future, are described. The most important challenges for the vaccine research are also discussed. The therapeutic use of herpesviruses includes recombinant HSV vectors for gene delivery or as anti-cancer agents. HSV therapeutic vectors are classified into: amplicon vectors, replication-defective vectors and replication-attenuated oncolytic viruses. This paper gives an insight into the current knowledge on the construction of HSV vectors for human therapy and describes the most recent advances in the oncolytic virotherapy.

1. Introduction. 2. Varicella-zoster virus vaccines. 3. Development of HSV, human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus vaccines. 4. Herpesviral vectors for human therapy. 5. Summary

Słowa kluczowe: herpeswirusy, szczepionki, terapia onkolityczna

Key words: herpesviruses, vaccines, oncolytic therapy

1. Wstęp

Herpeswirusy stanowią jedną z największych rodzin wirusowych, liczba jej przedstawicieli zidentyfikowanych do tej pory przekracza dwieście [12]. Gospodarzami herpeswirusów, z wyjątkiem jednego gatunku, są kręgowce [11], osiem gatunków jest odpowiedzialnych za infekcje u ludzi. Według obowiązującej nomenklatury [11] oznacza się je jako ludzkie herpeswirusy (human herpesvirus, HHV) 1–8, chociaż nadal często stosuje się nazwy zwyczajowe. Herpeswirusy patogenne dla człowieka reprezentują wszystkie trzy podrodziny *Herpesviridae*: α , β i γ . Herpeswirusy opryszczki HSV-1 (HHV-1) i HSV-2 (HHV-2) oraz wirus ospy wietrznej i półpaśca VZV (HHV-3) należą do podrodziny *Alphaherpesvirinae*, podrodzinę *Betaherpesvirinae* reprezentują ludzki cytomegalowirus HCMV (HHV-5) oraz wirusy rumienia nagłego HHV-6 i HHV-7; wirus Epsteina-Barr (HHV-4) oraz wirus mięsaka Kaposiego KSHV (HHV-8) to przedstawiciele *gammaherpesvirinae*. Herpeswirusy należą do jednych z najbardziej rozpowszechnionych wirusów w naszej populacji. U około 70–90% mieszkańców Europy (90% w Pols-

ce) wykrywa się przeciwciała specyficzne dla HSV-1, u 10–20% (9% w Polsce) – dla HSV-2, 40–60% dla HCMV, do 95% dla EBV [1, 26, 39]. Wartości te są znacznie wyższe, nawet do 100%, w niektórych rejonach geograficznych – zależnie od statusu socjoekonomicznego badanej populacji, wieku lub infekcji towarzyszących, np. u nosicieli wirusa HIV [2, 26]. Ludzkie herpeswirusy powodują u osób z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym choroby zwykle o przebiegu łagodnym lub wręcz infekcje bezobjawowe. Stają się groźne, gdy zawodzi kontrola układu immunologicznego: u osób z upośledzoną odpornością lub poddanych immunosupresji, po transplantacjach, w infekcji towarzyszącej HIV/AIDS, w okresie życia płodowego. Powikłania infekcji mogą obejmować zapalenie centralnego układu nerwowego, płuc, rogówki, wady wrodzone u dzieci i inne [1, 14]. EBV i KSHV to wirusy onkogenne, EBV jest jednym z najczęstszych wirusowych czynników etiologicznych nowotworów człowieka [28].

Herpeswirusy posiadają osłonkę okrywającą charakterystyczną warstwę białek zwaną tegumentem, kapsyd i materiał genetyczny, który stanowi dwuniciowy DNA

* Autor korespondencyjny: Katedra Wirusologii Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, tel. (58) 5236382, e-mail: andrea@biotech.ug.gda.pl

o długości do 235 tys. pz [35]. W osłonce zakotwiczone są m.in. glikoproteiny wirusowe, odpowiedzialne za wnikanie wirionów do komórek i stanowiące główny cel przeciwciał neutralizujących. Ekspresja genów herpeswirusowych to proces wieloetapowy i ściśle kontrolowany, odbywa się w sposób kaskadowy w trzech głównych fazach: natychmiastowo-wczesnej (α , immediate-early, IE), wczesnej (β , early, E) i późnej (γ , late, L) [35, 45]. W trakcie infekcji powstaje stosunkowo dużo białek, z których znakomita część indukuje silną odpowiedź immunologiczną. Po infekcji pierwotnej herpeswirusy przechodzą w stan utajenia – latencji – w komórkach nerwowych (HSV, VZV), limfocytach (HHV-6/7, EBV, KHSV), monocytach/makrofagach (CMV, HHV-6), komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego węzłów chłonnych i komórkach śródbłonka tętnic (HCMV), gdzie w określonych warunkach dochodzi do ich reaktywacji [3, 14, 38]. Podczas latencji zachodzi ograniczona ekspresja genów, głównie potrzebnych do zahamowania cyklu litycznego, nie wykrywa się produktów białkowych (HSV) lub ich liczba jest ograniczona. Reaktywacja ze stanu latencji oznacza spotkanie z wytworzoną w trakcie infekcji pierwotnej, gotową specyficzną odpowiedzią immunologiczną. Aby przetrwać w toku ewolucji herpeswirusy musiały wykształcić różnorodne mechanizmy hamowania odpowiedzi immunologicznej i dziś uznawane są za mistrzów ucieczki immunologicznej. Immunomodulacja dotyczy zarówno odpowiedzi wrodzonej, jak i nabytej. Znaczna część inhibitorów wirusowych hamuje aktywność limfocytów T cytotoksycznych CD8+, wskazując na istotną rolę tych komórek w kontroli zakażeń herpeswirusowych [16].

Infekcje herpeswirusowe kontroluje się przy pomocy chemioterapeutyków, głównie analogów nukleozydowych (acyklowir, gancyklowir, famcyklowir, walacyklowir) lub nukleotydomów (cidofowir) [46]. Ich wprowadzenie stało się przełomem w terapii zakażeń, jednakże pomimo opracowania leków modyfikowanych w celu poprawy biodostępności, zwiększenia aktywności przeciwwirusowej i zmniejszenia toksyczności nie doprowadziło do eradykacji wirusów z populacji. Za rozprzestrzenianie się herpeswirusów w populacji człowieka wini się dziś przede wszystkim asymptomatyczne wydalanie wirusa oraz zdolność do przebywania w stanie latencji [10, 19]. Wydaje się, że drogą do eliminacji zakażeń mogą być przede wszystkim szczepionki.

Badaniom klinicznym poddaje się dwa typy szczepionek: profilaktyczne i terapeutyczne. Szczepionki profilaktyczne mają za zadanie chronić przed infekcją osoby seronegatywne. Szczepionki terapeutyczne są przeznaczone dla osób, które przeszły infekcję i posiadają wirusy w stanie latencji. Mają one chronić przed reaktywacją wirusa lub ograniczać objawy z nią zwią-

zane. Testowane są zarówno preparaty tradycyjne, oparte na żywych atenuowanych szczepach wirusów lub szczepionkach podjednostkowych z rekombinowanymi białkami uzyskiwanymi w różnych systemach ekspresji, jak i nowoczesne preparaty wieloskładnikowe typu „prime-boost”, szczepionki oparte na wektorach pochodzących z innych wirusów, komórki prezentujące antygeny wirusowe, szczepionki DNA, szczepionki peptydowe. Testowane są różne adiuwanty. Dla herpeswirusów istnieją modele małych zwierząt (myszy, króliki, świnki morskie), ze względu na zdolność tych wirusów o szerokim zakresie gospodarza do ich infekcji (HSV) lub istnienie gatunków wirusów odpowiadających ludzkiemu (np. myszy cytomegalowirus). Modyfikacje genomów herpeswirusowych zostało w ostatnich latach znacznie ułatwione poprzez poznanie pełnych sekwencji wirusowego DNA oraz uzyskanie genomów w postaci sztucznych chromosomów bakteryjnych, tzw. BAC-ów (bacterial artificial chromosome), zdolnych do replikacji w komórkach bakteryjnych. Umieszczenie w DNA wirusowym sekwencji replikonu mini-F *Escherichia coli*, w najnowszych wersjach umożliwiające ich późniejsze usunięcie (systemy rekombinacji Red, loxP/rekombinaza Cre), pozwala na prostsze manipulacje wielkimi genomami herpeswirusowymi oraz zmiany genów upośredzających namnażanie się wirusów, a nawet genów kluczowych [5, 48, 49].

Pomimo tak wielokierunkowego podejścia i wieloletnich badań nad szczepionkami przeciw herpeswirusom jedyne preparaty komercyjne zostały uzyskane dla wirusa VZV.

2. Szczepionki przeciw wirusowi ospy wietrznej i półpaśca

Szczepionki przeciw VZV należą do szczepionek konwencjonalnych, ich podstawę stanowi ten sam żywy atenuowany szczep wirusa Oka (tzw. szczepionkowy szczep Oka, V-Oka od ang. vaccine = szczepionka). Jego szczep rodzicielski (tzw. P-Oka od ang. parental) został wyizolowany w 1974 roku w Japonii przez zespół Takahashiego od dziecka przechodzącego pełnoobjawową ospę wietrzną [3, 49]. Atenuacja została uzyskana przez wielokrotne pasażę w komórkach obcych gatunkowo (płodowe fibroblasty świnki morskiej) oraz ludzkich komórkach diploidalnych, jej mechanizm nie jest do końca poznany [3]. Dostępne są preparaty chroniące przed infekcją VZV i ospą wietrzną, głównie u dzieci (np.: Varivax[®], Varilrix[®]), również w wersji skojarzonej ze szczepionką świnka-odra różyczka, oraz szczepionka zapobiegająca reaktywacji wirusa i półpaścowi (Zostavax[®]).

Szczepionka profilaktyczna przeciw ospie wietrznej zastała wprowadzona w Stanach Zjednoczonych

w 1995 roku, w Polsce jest zalecana od 2003 roku. Ponad 10-letnia historia stosowania tej szczepionki pozwoliła na długoterminową ocenę jej skuteczności w czasie. Wyniki testu na dużej grupie szczepionych ujawniły zwiększanie się wraz z upływem lat częstości zachorowań na ospę u osób szczepionych (9 przypadków na 1000 osób po 5 latach i 58/1000 po 9 latach) [6]. Rezultatem było zarekomendowanie przez zespół przygotowujący wspomniany raport dwóch dawek szczepionki dla wszystkich dzieci i doszczepienie osób, które otrzymały jedną dawkę.

W roku 2006 zarejestrowano w Europie szczepionkę Zostavax, chroniącą przed półpaścem i jego najczęstszym powikłaniem, nerwobólem półpaścicowym (postherpetic neuralgia, PHN). Szczepionka ta jest zalecana dla ludzi po 50 roku życia, jej działanie przypisuje się intensyfikacji powstałej podczas infekcji pierwotnej komórkowej odpowiedzi immunologicznej, która ulega osłabieniu u osób starszych. Zostavax zawiera ten sam szczep V-Oka w dawce znacznie większej niż szczepionki przeciw ospie wietrznej, średnio 10–14 razy. Badania kliniczne na dużą skalę wykazały, iż szczepionka ta zmniejsza prawdopodobieństwo reaktywacji wirusa średnio o 51% (u osób powyżej 60 roku życia te wyniki były jeszcze lepsze) oraz znacznie zmniejsza nasilenie choroby i ryzyko wystąpienia powikłań [29].

Przez ostatnie lata badacze próbowali zrozumieć mechanizm atenuacji szczepu V-Oka. W tym celu dokonali jego charakterystyki molekularnej, poznano pełną sekwencję genomu szczepów P-Oka i V-Oka. Analiza porównawcza wykazała obecność 42 różnic nukleotydowych, większość z nich znajdowała się w genie głównego transaktywatora wirusowego, natychmiastowo-wczesnego białka IE62 [49]. Te różnice oraz dodatkowe delecje i insercje, m.in. w rejonie bliskim *origin* replikacji, mogą tłumaczyć słabszą replikację wirusa w hodowlach komórkowych *in vitro* i upośledzone rozprzestrzenianie się między komórkami. Genomy V-Oka i P-Oka zostały również skonstruowane w wersji BAC, co zdecydowanie powinno ułatwić dalszą charakterystykę szczepów tego trudnego do pracy w warunkach laboratoryjnych i modyfikacji genetycznych wirusa [49].

Najnowsze badania sugerują, iż skuteczność szczepionek anti-VZV jest związana z ich zdolnością do aktywacji składników odpowiedzi wrodzonej, głównie infiltrujących miejsce zakażenia komórek dendrytycznych [17]. Szczep szczepionkowy VZV utracił zdolność do blokowania szlaku sygnalizacji zależnego od receptorów Toll-podobnych (TLR)-2, promującego produkcję interleukiny 12, która wraz z IFN- γ wpływa na polaryzację odpowiedzi komórkowej w kierunku Th1, co ma kluczowe znaczenie dla kontroli infekcji.

Ponieważ istniejące szczepionki przeciw VZV uznawane są za bezpieczne i skuteczne, brak jest doniesień o opracowywaniu nowych preparatów.

3. Badania nad szczepionkami przeciw wirusom HSV, ludzkiemu cytomegalowirusowi i wirusowi Epsteina-Barr

Zupełnie inaczej wygląda stan profilaktyki i terapii zakażeń wirusami HSV, CMV i EBV. Ze względu na powszechność infekcji, koszty terapii chemioterapeutykami oraz wpływ chorób na jakość życia społeczeństwa w 1999 roku amerykański Instytut Medycyny uznał opracowanie skutecznej szczepionki przeciw tym wirusom za priorytetowe [22]. Próby konstrukcji skutecznych preparatów podejmuje się praktycznie od identyfikacji wirusów. Pierwsze testy obejmowały podejścia najbardziej tradycyjne: inaktywowane całe wiriony, atenuowane szczepy wirusów, szczepionki podjednostkowe oparte na składnikach inaktywowanych wirionów lub rekombinowanych białkach powierzchniowych stanowiących najczęstszy cel przeciwciał neutralizujących (białko gD HSV, gB HSV i HCMV, gp350 wirusa EBV) [19, 22, 46]. Jednakże te pierwsze szczepionki, dające obiecujące wyniki w fazie badań laboratoryjnych na modelach zwierzęcych, nie spełniły kryteriów odpowiedniej skuteczności w testach klinicznych. Spośród izolowanych od chorych atenuowanych szczepów wirusów testy kliniczne na szeroką skalę przeszedł szczep Towne wirusa CMV. Szczepionka ta okazała się być bezpieczna oraz indukowała produkcję przeciwciał neutralizujących i odpowiedź komórkową, zapobiegając w 89% objawom chorobowym u osób po transplantacji nerki, nie chroniła jednak przed przekazaniem wirusa biorcom lub reaktywacją wirusa [22]. Niepowodzeniem zakończyła się również próba zastosowania tej szczepionki w celu ochrony przed przekazaniem wirusa seronegatywnym matkom od zakażonych dzieci. Szczep Towne jest obecnie testowany w strategii typu „prime-boost”, gdzie szczepienie wirusem atenuowanym jest poprzedzone podaniem szczepionki DNA [21].

Jedne z największych testów dla HSV przeszły dwie szczepionki podjednostkowe. Pierwsza z nich – firmy Chiron, była oparta na białkach gD i gB HSV-2 izolowanych z hodowli komórek ssaczych CHO (Chinese hamster ovary) z emulsją skwalenu w wodzie jako adiuwantem (gD2/gB2/MF59). Szczepionka ta okazała się być bezpieczna i wywoływała produkcję przeciwciał neutralizujących na wysokim poziomie, ale przejściowo, dawała też zbyt niską ochronę przed infekcją HSV-2 (średnio 9% skuteczność) w dwóch dużych testach klinicznych, tzw. teście partnerów, gdzie badano przekazywanie wirusa między seronegatywnymi

Przykłady testowanych szczepionek przeciw wirusom opryszczki HSV [4, 7, 9, 18, 32, 42]

Wirus	Postać szczepionki	Nazwa szczepionki	Faza badań klinicznych
HSV-2	gB2/gD2/MF59 (Chiron)	Podjednostkowa, gB i gD otrzymane w komórkach CHO, emulsja skwalenu w wodzie jako adiuwant	III, wycofana*
HSV-2	gD2/alum/MPL (GSK)	Podjednostkowa, gD otrzymane w komórkach CHO, adiuwant glinowy i O-deacetylowany, monofosforylowany lipid A (MPL)	III
HSV-2	gD2/gC2	Podjednostkowa, gD i gC otrzymane w bakulowirusowym systemie ekspresji	Przedkliniczne na myszach
HSV-1	Lipopeptydowa gD1	Trzy pary połączonych peptydowych epitopów CD8+ i CD4+ z białka gD1z dołączonym kwasem palmitynowym	Przedkliniczne na myszach
HSV-1	pgB/Bax/dendrosomy	Szczepionka DNA, plazmid DNA kodujący gB z genem proapoptotycznym, dendrosomy jako nośnik DNA	Przedkliniczne na myszach
HSV-2/ HSV-1	dl5-29 (Acambis)	HSV-2 – wirus defektywny, delecja w genie UL5 (helikazy-primazy) i UL29 (główne białko wiążące DNA)	Przedkliniczne na myszach i świnkach morskich
HSV-2	ImmunoVEX (Biovex)	HSV-2 – wirus żywy atenuowany z delecją czterech genów kodujących białka immunomodulacyjne: ICP47, vhs, US5 i UL43	I
HSV-2	rVSV-gD2	gen gD2 w wektorze opartym na wirusie pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej	Przedkliniczne na myszach i świnkach morskich

* testy nie wykazały wystarczającej skuteczności szczepionki

i seropozytywnymi partnerami oraz w teście zapadalności na infekcje w grupie ryzyka, u osób z historią przebytych wcześniej innych chorób przenoszonych drogą płciową [7]. Firma GlaxoSmithKline zaproponowała szczepienie rekombinowanym białkiem gD wirusa HSV-2 (gD2/alum/MPL), również otrzymanym w komórkach CHO, ale z innym zestawem adiuwantów, wyniki testów klinicznych ukazały się w roku 2002. Szczepionka ta indukowała zarówno produkcję przeciwciał neutralizujących, jak i odpowiedź komórkową [41]. Testy kliniczne zakończyły się częściowym sukcesem – wykazano wysoką skuteczność u seronegatywnych kobiet (73% ochrona przed pojawieniem się objawów klinicznych infekcji, poziom ochrony przed przeniesieniem wirusa ok. 40%). Jednakże wyniki testów dla kobiet – nosicielek wirusa i mężczyzn niezależnie od ich statusu serologicznego wirusa były niewystarczające (średnia skuteczność szczepionki 38%).

Badania próbujące wyjaśnić fenomen wyników tak zależnych od płci osób szczepionych wykazały znacznie silniejszą u kobiet odpowiedź limfocytów T CD4+ na trzy z zestawu kilku immunodominujących epitopów pochodzących z białka gD2 [50] i nie wyklucza się, że podobne zjawisko ma miejsce dla limfocytów T CD8+. Różnice w aktywacji limfocytów mogą z kolei wynikać z innej u kobiet regulacji komórek prezentujących antygeny (APC), których różnicowanie jest podatne na wpływ hormonów płciowych, takich jak estrogen [23]. Niektórzy badacze wiążą różnice w wynikach szczepionek podjednostkowych obu firm z zastosowanymi adiuwantami, podkreślając w ten sposób znaczenie adiuwantów dla skuteczności szczepionek HSV [19, 46].

Po wielu badaniach zakończonych podobnie jak w przypadku szczepionek podjednostkowych HSV-2

niepowodzeniem, naukowcy powrócili do badań podstawowych przebiegu infekcji, immunobiologii, biologii molekularnej wirusów, poszukiwania nowych antygenów wirusowych. Wyniki tych badań często tłumaczą dotychczasowe niepowodzenia i wytyczają nowe strategie, m.in. podkreślają istotność aktywacji przez szczepionki składowej komórkowej odpowiedzi immunologicznej, głównie limfocytów T CD4+ i CD8+ w ochronie przed infekcjami pierwotnymi. Pierwsze podejścia szczepionkowe miały na celu wzbudzenie silnej produkcji przeciwciał neutralizujących, które uważa się za podstawę ochrony przed infekcjami pierwotnymi i transmisją przezłożyskową, ale, inaczej niż zakładano, które nie wydają się kontrolować reaktywacji wirusa [7, 22]. Szczepionki, które indukowały wysoki poziom przeciwciał, nie okazały się skuteczne, szczególnie w przypadku infekcji wtórnych. Obecnie podkreśla się rolę limfocytów T CD4+ typu Th1, produkujących m.in. IFN- γ , w szczepionkach terapeutycznych [19, 22]. Ponadto duże znaczenie ma poznawanie odpowiedzi immunologicznej związanej z błonami śluzowymi [10, 24] oraz mechanizmów jej immunomodulacji przez herpeswirusy. W idealnej szczepionce aktywność limfocytów T powinna towarzyszyć indukcji przeciwciał neutralizujących wirusa. Spośród innych ważniejszych odkryć na uwagę zasługuje m.in. wykazanie, iż ludzki cytomegalowirus używa nieco odmiennego repertuaru białek powierzchniowych do infekcji komórek nabłonkowych i śródbłonna naczyń niż fibroblastów [36], co może prowadzić do słabszej produkcji przeciwciał blokujących wejście do komórek, w których wirus przechodzi w stan latencji przez niektóre antygeny (np. białko gB) [8]. Dla skuteczności szczepień ważne mogą się okazać drogi podania szczepionki; testuje się poda-

wanie tzw. „bez użycia igieł” – z ang. „needle-free”: donosowe, doocne lub intrawaginalne [10, 18, 19].

Wyniki szczepionki gD2 firmy GSK dla kobiet, które nie zetknęły się wcześniej z wirusami HSV okazały się być na tyle obiecujące, by kontynuować testy kliniczne III fazy na dużo większej grupie (ponad 7000) seronegatywnych kobiet przed 30 rokiem życia. Badania nad tą szczepionką o nazwie HERPEVAC, współfinansowane przez rząd Stanów Zjednoczonych, miały się zakończyć pod koniec 2009 roku [30]. W przypadku pozytywnych wyników możemy doczekać się kolejnej, obok szczepionki podjednostkowej przeciw wirusowi brodawczaka ludzkiego HPV, szczepionki przeciw chorobie przenoszonej drogą płciową, zalecanej dla dziewcząt przed inicjacją seksualną. Nadal jednak pozostaje aktualny problem szczepień osób seropozytywnych pod względem HSV, w tym nosicieli HIV, i problem zapobiegania epidemiom HSV-2.

Spośród szczepionek podjednostkowych obiecujące wyniki, predysponujące do wprowadzenia preparatów na rynek, dały również badania kliniczne II fazy zastosowania rekombinowanego białka gB HCMV w kombinacji z adiuwantem MF59 dla seronegatywnych kobiet w kontroli zakażeń prenatalnych [32] oraz badania kliniczne II fazy z zastosowaniem rekombinowanego głównego białka osłonki gp350 EBV w zapobieganiu mononukleozie zakaźnej [40]. Pierwsza z nich, oparta podobnie jak szczepionki dla HSV, na białku izolowanym z kultur komórek CHO, w połączeniu z emulsją skwalenu z wodą (MF59) jako adiuwantem, dała 50% skuteczność [33]. Szczepionka przeciw EBV (białko gp350 z wodorotlenkiem glinu i AS04 jako adiuwantami) okazała się skuteczna w 78% w ochronie przed pojawianiem się objawów klinicznych mononukleozy [40].

W grupie szczepionek opartych na żywych wirusach większe nadzieje wiąże się ze specjalnie zaprojektowanymi szczepionkami z żywymi atenuowanymi wiru-

sami z delecją m.in. genu kodującego główny czynnik neurowirulencji – białko γ 34.5, genów białek immunomodulacyjnych (np. znajdujący się obecnie w I fazie badań klinicznych ImmunoVEX HSV2 [42]) lub wirusami niezdolnymi do replikacji (np. znajdujący się w fazie badań przedklinicznych HSV-1 dl5-29) – wektory te dają obiecujące wyniki u szczepionych myszy i świnek morskich, również jako szczepionki terapeutyczne [9, 18].

Testowane są również szczepionki zawierające inne antygeny wirusowe, ich kombinacje lub syntetyczne peptydy stanowiące epitopy rozpoznawane przez limfocyty T w kompleksach z lipidami. Te ostatnie mogą zawierać tzw. „epitopy asymptomatyczne” – peptydy stanowiące unikalny zestaw epitopów rozpoznawanych przez limfocyty T u pacjentów, u których nie rozwijają się objawy chorobowe, co oznacza, iż lepiej zwalczają oni infekcję [10]. Podstawy tego zjawiska są również w trakcie badań. Dołączenie w szczepionkach lipopeptydowych reszty kwasu tłuszczowego, takiego jak kwas palmitynowy, stanowi wewnętrzny adiuwant, wzmacniający indukcję odpowiedzi immunologicznej, szczególnie prezentację antygenów przez komórki dendrytyczne/komórki Langerhansa związane z błonami śluzowymi i aktywację limfocytów CD8+ [10, 22].

Obiecujące wyniki prezentują również szczepionki oparte na innych wektorach wirusowych: m.in. dla HCMV oparta na wektorze alfawirusowym przenoszącym gen gB lub gen fuzyjny pp65/IE1, dla HCMV oparta na wektorze MVA (modyfikowany wirus vaccinia szczep Ankara) przenoszącym również gen gB, dla EBV zastosowanie koktajlu białek litycznych i latentnych przenoszonych przez wirus vaccinia (VV) [22, 25]. W przypadku szczepionek terapeutycznych przeciw nowotworom związanym z EBV ich podstawę powinny stanowić antygeny charakterystyczne dla

Tabela II

Przykłady testowanych szczepionek przeciw wirusom HCMV i EBV [21, 22, 25, 27, 36, 40]

Wirus	Nazwa szczepionki	Postać szczepionki	Faza badań klinicznych
CMV	VCL-CB01 (Vical)	Szczepionka DNA, plazmidy kodujące pp65 i gB	II
CMV	gB/MF59 (Sanofi Pasteur, wcześniej Chiron)	Skrócona, sekrecyjna forma gB produkowana w komórkach CHO	II
CMV	gB/pp65/IE1 (AlphaVax/Novartis)	Replikon alfaherpeswirusowy jako nośnik	I/II
CMV	VCL-CT02/Towne	Szczepionka typu „prime-boost”: trójwalentna DNA, plazmidy kodujące pp65, gB i IE1, doszczepienie żywym atenuowanym szczepem Towne	I
EBV	gB/wodorotlenek glinu/AS04	Podjednostkowa, rekombinowane gB z komórek CHO, wodorotlenek glinu i AS04 jako adiuwanty	II
EBV	Poczwórna VV z koktajlem białek cyklu litycznego i latencji	gp350/gp110/EBNA2/EBNA-3C w wektorze vaccinia	Przedkliniczne na myszach
EBV	Ad-SAVINE	Epitopy białek latencji LMP1 i LMP2 w wektorze adenowirusowym	Przedkliniczne

latencji, takie jak białko złożone z epitopów pochodzących z LMP1 i LMP2 w szczepionce adenowirusowej Ad-SAVINE [27].

Inną strategię stanowią szczepionki DNA oparte na plazmidach niosące geny najbardziej immunogennych białek, głównie powierzchniowych (np. gB HSV-1 [32], gB HCMV w kombinacji z immunodominującym białkiem pp65 [36]), wymagają one jednak zastosowania dodatkowych modyfikacji mających na celu wzmocnienie ich immunogenności. Testuje się więc dodatek adiuwantów, zastosowanie koekspresji z genami białek proapoptotycznych (Bax) lub genem receptora dla limfotoksyny należącego do rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów TNF (LIGHT). Indukcja apoptozy w komórkach produkujących antygen wirusowy zwiększa ich usuwanie przez APC, takie jak komórki dendrytyczne, oraz aktywację limfocytów CD4+ i CD8+ w organach limfatycznych [36].

4. Wektory herpeswirusowe w terapii człowieka

Równoległe z rozwojem szczepionek przeciw herpeswirusom testowane są różne podejścia mające na celu „przebrojenie” arsenału wirusowego w celu ich wykorzystania jako środków w terapii człowieka. Wektory oparte na wirusie HSV (głównie HSV-1) są bardzo obiecującymi kandydatami w terapii wirusowej głównie chorób o podłożu neurologicznym oraz nowotworów. Cechy, które zdecydowały o zainteresowaniu badaczy to m.in. infekcyjność względem różnych typów komórek, zarówno dzielących się, jak i nie dzielących, przede wszystkim neuronów, zdolność do inkorporacji dużych fragmentów obcego DNA (teoretycznie do 152 tys. pz w przypadku amplikonów), brak integracji wektorów do DNA chromosomalnego komórki, możliwość wykonywania testów wektorów na modelach małych zwierząt, czy też możliwość kontroli namnażania przy pomocy leków przeciwherpeswirusowych [43, 45].

Konstruuje się kilka rodzajów wektorów herpeswirusowych, w zależności od ich zdolności replikacyjnych:

- Wektory amplikonowe (amplikony) – plazmidy bakteryjne zawierające jako jedyne elementy pochodzące z HSV *origin* replikacji (*oriS*), sygnał cięcia/pakowania DNA (*pac*) i kasetę umożliwiającą ekspresję przenoszonego genu. DNA plazmidowy w formie konkatamerycznej jest pakowany do cząstek wirusowych HSV. Replikacja i pakowanie wymagają obecności DNA wirusów pomocniczych, którymi coraz częściej są, w miejsce wirusów zdolnych do replikacji, wirusy defektywne w postaci BAC. Amplikony są testowane jako wektory szczepionkowe (np. do ekspresji genów HIV, wirusa zapalenia wątroby typu C) lub wektory przenoszące geny terapeutyczne

w terapii genowej człowieka, np. w leczeniu uszkodzeń mózgu (ekspresja nerwowego czynnika wzrostu NGFR, genów białek szoku termicznego, genów białek antyapoptotycznych). Badania z użyciem amplikonów są hamowane przez niskie miana wektorów uzyskiwanych w systemach wolnych od wirusa pomocniczego zdolnego do replikacji [13, 45].

- Wektory defektywne, niezdolne do replikacji i tworzenia cząstek potomnych, produkowane w liniach komórek komplementujących funkcje usuniętych genów – testowane również jako wektory szczepionkowe (dl5-29), są przeznaczone głównie do przenoszenia genów terapeutycznych takich białek jak neuroprzebieżniki, neuroreceptory, czynniki wzrostu i inne, w schorzeniach neurodegeneracyjnych i dziedzicznych wadach genetycznych. Ciekawym podejściem jest również zastosowanie wektora produkującego enkefalinę do zwalczania bólu w chorobach nowotworowych [45].
- Wektory HSV atenuowane, zdolne do ograniczonej lub warunkowej replikacji, mogą służyć jako typowe wektory onkolityczne (oHSV). Selektywność namnażania w komórkach nowotworowych i ich niszczenia uzyskuje się poprzez usunięcie z genomu HSV genów enzymów związanych z metabolizmem DNA, takich jak kinaza tymidynowa (HSV-TK) lub reduktaza rybonukleotydowa (HSV-RR) [44, 45]. Enzymy te umożliwiają wirusowi tworzenie prekursorów nukleotydów w komórkach nie dzielących się lub o ograniczonej liczbie podziałów. Po delecji genów TK lub RR wirus może się replikować jedynie w komórkach intensywnie dzielących się, takich jak komórki nowotworowe. W testowanych obecnie wektorach tzw. trzeciej generacji modyfikacjom TK i RR towarzyszą dodatkowe delecje genów, zwiększające bezpieczeństwo wektorów, m.in. głównego czynnika neurowirulencji – białka γ_1 34.5, białek pośredniczących w rozprzestrzenianiu się wirusa, genów związanych z latencją. Produkt genu γ_1 34.5 jest białkiem multifunkcyjnym, jedna z jego funkcji polega na ochronie przed mechanizmem przeciwwirusowej odpowiedzi wrodzonej komórki opartej na kinazie białkowej R (PKR). Białko ICP34.5 defosforyluje czynnik translacyjny eIF-2 α , odwracając w ten sposób efekt jego fosforylacji przez PKR, która zatrzymuje syntezę białek w komórce [44]. Szczepy HSV z mutacjami w genie γ_1 34.5 mogą się replikować jedynie w komórkach z aktywną ścieżką sygnalizacyjną Ras, która hamuje aktywację PKR. Białko ICP47 jest z kolei głównym czynnikiem immunomodulacyjnym wirusa, jego delecja zwiększa prezentację antygenów w kompleksach z białkami głównego układu zgodności tkankowej MHC klasy I i stymulację nowotworospecyficznych limfocytów T cytotoksycznych [16, 43].

Tabela III

Przykłady testowanych wektorów onkolitycznych opartych na wirusie HSV-1 [15, 44, 45, 47]

Nazwa preparatu	Modyfikacje wektora	Zastosowanie	Faza badań klinicznych
G47Δ	ΔUL39 (RR) ICP47-	Glejak Rak odbytnicy Rak piersi	Przedkliniczne/I Przedkliniczne Przedkliniczne
G207	Δγ34.5 (2) ΔUL39 (RR)	Glejak Rak piersi	I/II Przedkliniczne
NV1020	Δγ 34.5(1) ΔUL56, ΔUL24 gJ/gG/PK HSV-2	Przerzutujący rak jelita grubego Przerzutujący rak prostaty Rak piersi, rak wątroby	I/II Przedkliniczne Przedkliniczne
NV1042	Δγ 34.5 (1) ΔUL56 gJ/gG/PK HSV-2 ICP47-, US11-US10-, IL12+	Przerzutujący rak prostaty Rak piersi	Przedkliniczne Przedkliniczne
OncoVEX ^{GALV/CD}	ΔUL39 (RR) Δγ 34.5 (2)* ICP47- GALV <i>env</i> <i>Fcy::Fur</i>	Rak przełyku Rak płaskokomórkowy skóry Glejak	Przedkliniczne Przedkliniczne Przedkliniczne
OncoVEX ^{GM-CSF}	ΔUL39 (RR), Δγ 34.5 (2)* ICP47-, GM-CSF+	Czerniak Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi	III III
HF10	ΔUL43, ΔUL49.5, ΔUL55, ΔUL56, ΔLAT	Wznowy raka piersi Nawrotowy rak głowy i szyi Czerniak	I I Przedkliniczne

* (1) – delecja jednej kopii genu; (2) – delecja obu kopii genu

Wektory trzeciej generacji zawierają często dodatkowe geny, wzmagające ich potencjał lityczny (np. białko fuzyjne wirusa GALV). Aktywność wektorów onkolitycznych HSV może być dodatkowo wzmocniona poprzez umieszczenie w wektorze genów enzymów aktywujących proleki chemioterapeutyczne (np. OncoVEX^{GALV/CD} z drożdżową deaminazą cytydyny aktywującą 5-fluorocytozynę do 5-fluorouracylu [34]) lub białek o aktywności przeciwnowotworowej, cytokin i innych. Badania I fazy potwierdzają ich bezpieczeństwo (brak objawów chorobowych) oraz łagodne efekty uboczne (przejściowo: gorączka, dreszcze). W fazach I lub II badań klinicznych znajdują się wektory do terapii glejaków (G207) oraz nowotworów wątroby, przewodu pokarmowego, raka piersi (HF10), płaskonabłonkowego raka głowy i szyi [44, 45]. Najbardziej zaawansowane badania dotyczą wektora OncoVex^{GM-CSF}, który wszedł w III fazę badań klinicznych po wykazaniu 26% długotrwałej (do 31 tygodni) redukcji masy guzów, bezpośrednio nastrzykiwanych oraz dzięki aktywacji odpowiedzi immunologicznej również guzów sąsiednich [37]. Problemem wektorów HSV jest ich ograniczone rozprzestrzenianie się w miejscu podania, co próbuje się poprawić związkami drobnocząsteczkowymi wpływającymi na replikację wirusa lub enzymami degradującymi matriks zewnątrzkomórkową. Wektory podaje się doguzowo lub w miejsce po resekcji guzów. Trwają również badania nad

zwiększeniem trwałości wektorów HSV w krwiobiegu, głównie ochrony przed składnikami układu dopełniacza (przedtraktowanie czynnikiem jadu kobry lub cyklofosfamidem [20]), co umożliwiłoby obok doguzowego, również dożylnego podawanie wirusów.

5. Podsumowanie

Przedstawiciele rodziny *Herpesviridae* należą do najbardziej rozpowszechnionych patogenów wirusowych w naszej populacji. Częstość zakażeń herpeswirusowych wzrasta z roku na rok pomimo istnienia skutecznych chemioterapeutyków, głównie ze względu na asymptomatyczne wydalanie wirusów oraz zdolność herpeswirusów do przebywania w stanie latencji i cyklicznych reaktywacji. Dlatego uzasadniony wydaje się pogląd, iż do eradykacji herpeswirusów mogą się przyczynić przede wszystkim szczepionki, jako uzupełnienie stosowania leków. Pomimo wieloletnich i różnorodnych badań wciąż jedyne komercyjne szczepionki są dostępne dla wirusa ospy wietrznej i półpaśca. Dzięki najnowszym badaniom coraz więcej wiemy o szczepie szczepionkowym wirusa VZV, mechanizm jego atenuacji i zarazem skuteczności tej szczepionki są lepiej zrozumiałe. Opracowanie skutecznych szczepionek przeciw głównym herpeswirusowym patogenom człowieka: wirusom CMV, EBV i HSV-2

znajdują się na liście celów priorytetowych. Najbardziej pożądana jest konstrukcja szczepionek profilaktycznych, które chroniłyby osoby seronegatywne i w tej dziedzinie testy kliniczne osiągnęły najlepsze wyniki. Coraz więcej badań potwierdza fakt, iż odporność powstała w wyniku infekcji pierwotnej nie chroni przed reaktywacją wirusa. Szczepionki profilaktyczne i terapeutyczne będą musiały najprawdopodobniej aktywować inne składniki odpowiedzi immunologicznej a dobór antygenów szczepionkowych musi być dobrze przemyślany. Po latach nieskutecznych prób naukowcy wrócili do „stołów laboratoryjnych” – badań podstawowych wirusów, co zaowocowało zwiększoną liczbą nowych podejść i testów klinicznych. Należy również zauważyć, iż w przypadku każdego z patogenów może okazać się skuteczne różne podejście, ponieważ pomimo wielu wspólnych cech biologicznych wirusy nawet bliżej ze sobą spokrewnione różnią się między sobą (m.in. tropizmem, immunobiologią, repertuarem białek powstających w czasie latencji, mechanizmami immunomodulacyjnymi). Rozwój wirusowych wektorów szczepionkowych przyczynił się również do idei wykorzystania wektorów opartych na wirusie HSV w terapii genowej i onkolitycznej terapii nowotworów człowieka. Nowe metody biologii molekularnej znajdują swe zastosowanie w optymalizacji produkcji wektorów wirusowych, zwiększa się też ich bezpieczeństwo, co skutkuje testami wektorów w terapii coraz to nowych rodzajach nowotworów. Wektory onkolityczne mogą stanowić korzystne uzupełnienie radio- i chemioterapii.

Piśmiennictwo

1. A WHO Meeting: Prevention and control of herpesvirus diseases. Part I. Clinical and laboratory diagnosis and chemotherapy. *Bull. World Health Organ.* **63**, 185–201 (1985)
2. Andreoletti L., L. Belec i wsp.: High seroprevalence of herpes simplex virus type 2 infection in French human immunodeficiency virus type 1-infected outpatients. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4215–427 (2005)
3. Arvin A.M., Gershon A.A.: Live attenuated varicella vaccine. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 59–100 (1996)
4. Awasthi S., Lubinski J.M., Friedman H.M.: Immunization with HSV-1 glycoprotein C prevents immune evasion from complement and enhances the efficacy of an HSV-1 glycoprotein D subunit vaccine. *Vaccine*, **27**, 6845–6853 (2009)
5. Brune W., Messerle M., Koszinowski U.H.: Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.* **16**, 254–259 (2000)
6. Chaves S.S., Gargiullo P., Zhang J.X., Civen R., Guris D., Mascola L., Seward J.F.: Loss of vaccine-induced immunity to varicella over time. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1121–1129 (2007)
7. Corey L., S.E. Straus i wsp.: Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA*, **282**, 331–340 (1999)
8. Cui X., Meza B.P., Adler S.P., McVoy M.A.: Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine*, **26**, 5760–5766 (2008)
9. Da Costa X.J., Jones C.A., Knipe D.M.: Immunization against genital herpes with a vaccine virus that has defects in productive and latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6994–6998 (1999)
10. Dasgupta G., Chentoufi A.A., Nesburn A.B., Wechsler S.L., BenMohamed L.: New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield. *Expert Rev. Vaccines* **8**, 1023–1035 (2009)
11. Davison A.J.: Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* **143**, 52–69 (2010)
12. Ehlers B., Discovery of herpesviruses (w) *Encyclopedia of Virology*, 3rd edition, red. B. Mahy, M. van Regenmortel, Elsevier, Amsterdam, 2008, s. 421–429
13. Epstein A.L.: HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **104**, 399–410 (2009)
14. Figlerowicz M.: Najczęstsze postacie kliniczne zakażeń wywołanych przez wirusy z rodziny *Herpesviridae*. *Przew. Lek.* **8**, 61–67 (2006)
15. Geevarghese S.K., Geller D.A., de Haan H., Hörer M., Knoll A., Mescheder A., Nemunaitis J., Reid T., Sze D.Y., Tanabe K.K.: Phase I/II study of an oncolytic herpes simplex virus, NV1020, in patients with heavily pretreated refractory colorectal cancer metastatic to the liver. *Hum. Gene Ther.* doi:10.1089/hum.2010.020 (2010)
16. Griffin B.D., Verweij M.C., Wiertz E.J.: Herpesviruses and immunity: the art of evasion. *Vet. Microbiol.* **143**, 89–100 (2010)
17. Gutzeit C., G. Schönrich i wsp.: Identification of an important immunological difference between virulent varicella-zoster virus and its avirulent vaccine: viral disruption of dendritic cell instruction. *J. Immunol.* **185**, 488–497 (2010)
18. Hoshino Y., Pesnicak L., Dowdell K.C., Burbelo P.D., Knipe D.M., Straus S.E., Cohen J.I.: Protection from herpes simplex virus (HSV)-2 infection with replication-defective HSV-2 or glycoprotein D2 vaccines in HSV-1-seropositive and HSV-1-seronegative guinea pigs. *J. Infect. Dis.* **200**, 1088–1095 (2009)
19. Hosken N.A.: Development of a therapeutic vaccine for HSV-2. *Vaccine*, **23**, 2395–2398 (2005)
20. Ikeda K., Wakimoto H., Ichikawa T., Jung S., Hochberg F.H., Louis D.N., Chiocca E.A.: Complement depletion facilitates the infection of multiple brain tumors by an intravascular, replication-conditional herpes simplex virus mutant. *J. Virol.* **74**, 4765–4775 (2000)
21. Jacobson M.A., Adler S.P., Sinclair E., Black D., Smith A., Chu A., Moss R.B., Wloch M.K.: A CMV DNA vaccine primes for memory immune responses to live-attenuated CMV (Towne strain). *Vaccine*, **27**, 1540–1548 (2009)
22. Khanna R., Diamond D.J.: Human cytomegalovirus vaccine: time to look for alternative options. *Trends Mol. Med.* **12**, 26–33 (2006)
23. Kovats S., Carreras E.: Regulation of dendritic cell differentiation and function by estrogen receptor ligands. *Cell Immunol.* **252**, 81–90 (2008)
24. Kwant-Mitchell A., Ashkar A.A., Rosenthal K.L.: Mucosal innate and adaptive immune responses against herpes simplex virus type 2 in a humanized mouse model. *J. Virol.* **83**, 10664–10676 (2009)

25. Lockey T.D., Zhan X., Surman S., Sample C.E., Hurwitz J.L.: Epstein-Barr virus vaccine development: a lytic and latent protein cocktail. *Front. Biosci.* **13**, 5916–5927 (2008)
26. Looker K.J., Garnett G.P., Schmid G.P.: An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. *Bull. World Health Organ.* **86**, 805–812 (2008)
27. Lutzky V.P., Corban M., Heslop L., Morrison L.E., Crooks P., Hall D.F., Coman W.B., Thomson S.A., Moss D.J.: Novel approach to the formulation of an Epstein-Barr virus antigen-based nasopharyngeal carcinoma vaccine. *Vaccine*, **26**, 5760–5766 (2008)
28. Martin D., Gutkind J.S. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene*, **27** Suppl 2, 31–42 (2008)
29. Mills R., Tyring S.K., Levin M.J., Parrino J., Li X., Coll K.E., Stek J.E., Schlienger K., Chan I.S., Silber J.L.: Safety, tolerability, and immunogenicity of zoster vaccine in subjects with a history of herpes zoster. *Vaccine*, **28**, 4204–4209 (2010)
30. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, <http://www.niaid.nih.gov/topics/genitalherpes/research/herpevac/Pages/Default.aspx> (2 sierpnia 2010 roku)
31. Oxman M.N., J.L. Silber i wsp.: A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2271–2284 (2005)
32. Parsania M., Bamdad T., Hassan Z.M., Kheirandish M., Pouriayevali M.H., Sari R.D., Jamali A.: Evaluation of apoptotic and anti-apoptotic genes on efficacy of DNA vaccine encoding glycoprotein B of Herpes Simplex Virus type 1. *Immunol. Lett.* **128**, 137–142 (2010)
33. Pass R.: Development and evidence for efficacy of CMV glycoprotein B vaccine with MF59 adjuvant. *J. Clin. Virol.* **46** Suppl 4, 73–76 (2009)
34. Price D.L., Lin S.F., Han Z., Simpson G., Coffin R.S., Wong J., Li S., Fong Y., Wong R.J.: Oncolysis using herpes simplex virus type 1 engineered to express cytosine deaminase and a fusogenic glycoprotein for head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **136**, 151–158 (2010)
35. Roizman, B., Pellett P.E., The family Herpesviridae: A brief introduction (w) Field's Virology, 5th edition, red. D.M. Knipe, P.M. Howley, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, s. 2479–2500
36. Schleiss M.R.: VCL-CB01, an injectable bivalent plasmid DNA vaccine for potential protection against CMV disease and infection. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **11**, 572–578 (2009)
37. Senzer N.N., J.J. Nemunaitis i wsp.: Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5763–5771 (2009)
38. Sinclair J., Sissons P.: Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **87**, 1763–1779 (2006)
39. Smith J.S., Rosinska M., Trzcinska A., Pimenta J.M., Litwinska B., Siennicka J.: Type specific seroprevalence of HSV-1 and HSV-2 in four geographical regions of Poland. *Sex Transm. Infect.* **82**, 159–163 (2006)
40. Sokal E.M., Hoppenbrouwers K., Vandermeulen C., Moutschen M., Léonard P., Moreels A., Haumont M., Bollen A., Smets F., Denis M.: Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* **196**, 1749–1753 (2007)
41. Stanberry L.R., G. Dubin i wsp.: Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1652–1661 (2002)
42. Thomas S., Barton S., Reay P., Marshall T., Love C., Goldsweig H., Coffin R.S.: Clinical development of an immune evasion gene-deleted live attenuated vaccine for HSV-2 (ImmunoVEX HSV2). 35th International Herpesvirus Workshop Poster 9.12 (2010)
43. Todo T., Martuza R.L., Rabkin S.D., Johnson P.A.: Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6396–6401 (2001)
44. Todo T.: “Armed” oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell Adh. Migr.* **2**, 208–213 (2008)
45. Watanabe D.: Medical application of herpes simplex virus. *J. Derm. Sci.* **57**, 75–82 (2010)
46. Wilson S.S., Fakioglu E., Herold B.C.: Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **7**, 559–568 (2009)
47. Wong J., Kelly K., Mittra A., Gonzalez S.J., Song K.Y., Simpson G., Coffin R., Fong Y.: A third-generation herpesvirus is effective against gastroesophageal cancer. *J. Sur. Res.* doi: 10.1016/j.jss.2010.03.021 (2010)
48. Wussow F., Fickenscher H., Tischer B.K.: Red-mediated transposition and final release of the mini-F vector of a cloned infectious herpesvirus genome. *PLoS One*, **4**(12): e8178 (2009)
49. Yamanishi K.: Molecular analysis of the Oka vaccine strain of varicella-zoster virus. *J. Infect. Dis.* **197**, Suppl. 2, 45–48 (2008)
50. Zhang X., Castelli F.A., Zhu X., Wu M., Maillère B., BenMohamed L.: Gender-dependent HLA-DR-restricted epitopes identified from herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1436–1449 (2008)

Małgorzata Fleischer

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Akademia Medyczna, Wrocław

Nosocomial infection prophylaxis in Koch's time and today

Abstract: Nosocomial infections occurred since the establishment of first hospitals but their specificity and methods of prophylaxis have undergone great changes over the course of time. In this article, several chosen elements crucial to the success of infection prevention in hospitalized patients are presented with the emphasis on the meaning of the 19th century pioneer research which should be considered as the beginning of antiseptics and asepsis. Special attention was paid to the merits of Robert Koch who, among other things, devised methods for the evaluation of disinfectants activity and also conducted research on the means of thermal destruction of microorganisms with the use of dry hot air [dry heat sterilization] and steam. It has been stressed that despite the major development of science and technology, hospital-acquired infections remain a problem of contemporary medicine which is connected with patients being more vulnerable to diseases as well as poor prophylaxis.

Słowa kluczowe: zakażenia szpitalne, aseptyka, antyseptyka, sterylizacja

Key words: nosocomial infections, asepsis, antiseptics, sterilization

Mimo intensywnego rozwoju medycyny i wprowadzenia do terapii nowych metod leczenia nadal choroby infekcyjne stanowią jedną z głównych przyczyn zachorowalności i śmiertelności w populacji. Szczególnym problemem są zakażenia pacjentów hospitalizowanych, ze względu na częstą lekooporność szczepów odpowiedzialnych za ich wystąpienie oraz czynniki ryzyka związane z pacjentem, takie jak choroba podstawowa (np. nowotwór, cukrzyca, niewydolność narządowa), konieczność stosowania inwazyjnych metod diagnostycznych i terapeutycznych, leczenie immunosupresyjne itp. Zakażenia szpitalne tylko w USA rocznie rozpoznawane są u około 1,7 miliona hospitalizowanych stanowiąc bezpośrednią lub pośrednią przyczyną zgonu około 99 000 z nich [20]. Koszty związane z leczeniem zakażeń szpitalnych wahają się od 28 do 33 miliardów dolarów, a do szczególnie kosztownych należą zakażenia krwi (36 441 \$/przypadek) i zakażenia miejsca operowanego (25 546 \$/przypadek) [41]. Infekcje u hospitalizowanych chorych występują od początku istnienia szpitali, jednak ich specyfika i profilaktyka uległy znacznym zmianom w czasie. Obok „tradycyjnych” patogenów takich jak np. ropotwórcze paciorkowce pojawiły się nowe, nienotowane wcześniej czynniki chorobotwórcze, np. prątki niegruźlicze [46], wirusy zapalenia wątroby typu C [44] czy priony [21]. W wyniku presji antybiotykowej zostały wyselekcjonowane wielooporne szczepy, w tym odporne na β -laktamy pałeczki Gram-ujemne [7, 22, 34] wielooporne *Mycobacterium tuberculosis* [19], metycylooporne *S. aureus* [22, 34] i wankomycylooporne enterokoki [6]. Antybiotykoterapia stała się czynnikiem ryzyka biegunek poantybiotykowych i rzekomobłoniastego zapalenie jelit, a także związane z wysoką

śmiertelnością toksycznego rozszerzenia okrężnicy z udziałem *Clostridium difficile* [24, 45]. Coraz większa liczba chorych w immunosupresji ulega zakażeniom oportunistycznym, wśród których szczególnie istotne ze względu na ciężkość przebiegu i wysoką śmiertelność, są zakażenia grzybicze, w tym kandydozy [48], aspergilozy [28] i zygomycyzy [40]. Rozwój techniki medycznej pozwolił wprowadzić do leczenia sprzęt umożliwiający stosowanie inwazyjnych metod badań i terapii, niemniej ubocznymi skutkami stosowania takich metod stały się towarzyszące im zakażenia [1]. Jedne z najczęstszych, a jednocześnie potencjalnie najgroźniejsze są odcewnikowe zakażenia krwi [6, 32]. Istotne znaczenie mają także zapalenia płuc związane z mechaniczną wentylacją, zakażenia układu moczowego u cewnikowanych chorych [34] i infekcje wynikające z nieprawidłowej dekontaminacji endoskopów [12, 26, 37, 47]. Zazwyczaj czynnikami etiologicznymi zakażeń szpitalnych są bakterie, niemniej stosowanie inwazyjnego sprzętu wiąże się także z ryzykiem wirusowych zakażeń przenoszonych drogą krwi, w tym przede wszystkim HBV [11] i HCV [13, 36].

Skuteczne ograniczanie zakażeń związanych z hospitalizacją jest procesem złożonym, zależnym od trzech podstawowych elementów: wiedzy z zakresu epidemiologii tych zakażeń, prawidłowej higieny szpitalnej warunkującej skuteczne przecięcie dróg przenoszenia się drobnoustrojów i przestrzegania zasad aseptyki koniecznej w ochronie przed zakażeniem osób poddawanych procedurom inwazyjnym.

W czasach Roberta Kocha (1843–1910) wiedza na temat zakażeń i patogenów była niewielka, a wymiana obserwacji i doświadczeń znacznie ograniczona. Współczesna infekcjologia oparta jest na

szeroko rozbudowanych metodach diagnostyki mikrobiologicznej i wielośrodkowych, często międzykontynentalnych obserwacjach. W czasach współczesnych możliwe jest wczesne ostrzeżenie o zagrożeniach infekcyjnych a źródłem informacji są między innymi CDC (Centers for Disease Control and Prevention) w USA i ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) w Europie, a także WHO. W zakresie zakażeń szpitalnych prowadzone są programy monitorowania takie jak np. HELICS zajmujący się kolekcjonowaniem, analizą i rozpowszechnieniem danych dotyczących zakażeń w szpitalach Europy. W ramach tego programu funkcjonuje HELICS SSI monitorujący zakażenia miejsca operowanego [50] i HELICS ICU monitorujący zakażenia na oddziałach intensywnej terapii [42]. Zakażenia u hospitalizowanych chorych są także celem badań ESGNI (European Study Group on Nosocomial Infections) funkcjonującej pod patronatem ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) [3, 4, 25]. W USA w 2005 roku powstał National Healthcare Safety Network (NHSN) integrując trzy wcześniej istniejące systemy nadzoru CDC: nadzór nad zakażeniami szpitalnymi (National Nosocomial Infections Surveillance; NNIS), dializami (Dialysis Surveillance Network; DSN) i system nadzoru dla pracowników opieki zdrowotnej (National Surveillance System for Healthcare Workers; NaSH). Podobnie jak w NNIS system NHSN oparty jest na dobrowolnym raportowaniu zakażeń związanych z opieką zdrowotną (Health care-associated infection; HAI) a uzyskane informacje stanowią podstawę do oceny częstości tych zakażeń i szybkiego rozpoznawania aktualnych zagrożeń. Informacje uzyskane z NHSN stanowią podstawę do aktualizacji metod nadzoru [14]. Zakażenia są rozpoznawane w oparciu o kryteria zdefiniowane przez CDC z uwzględnieniem zwłaszcza odcewnikowych zakażeń krwi, związanych z wentylacją zapaleń płuc i zakażeń układu moczowego u pacjentów cewnikowanych [18]. Międzynarodowe Konsorcjum Kontroli Zakażeń Szpitalnych (International Nosocomial Infection Control Consortium, INICC) prowadzi program kontroli HAI z monitorowaniem opartym na systemie US National Healthcare Safety Network. INICC zostało utworzone w celu promowania kontroli opartej na dowodach w krajach uboższych i rozwiniętych ale bez wystarczającego doświadczenia w nadzorze nad zakażeniami szpitalnymi i w monitorowaniu opartym na analizie i zwrotnej informacji o wynikach zebranych przez szpitale uczestniczące w programie. Program INICC został zapoczątkowany w 1998 roku w Ameryce Południowej, a już w latach 2002–2007 obejmował 98 oddziałów intensywnej terapii w 18 krajach Ameryki Łacińskiej, Azji, Afryki i Europy, stanowiąc wiarygodne źródło międzynarodowych danych o epidemiologii zakażeń szpitalnych [33].

W celu znormalizowania kolekcjonowania danych o HAI w nadzorze nad zakażeniami wprowadzane są systemy informatyczne, których wykorzystanie pozwala oszczędzić czas i znacznie ułatwia ocenę zagrożeń oraz skuteczności stosowanych metod profilaktyki [15, 17]. Jednym z ważnych zalet takiego nadzoru jest np. szybka identyfikacja pacjentów wcześniej zakażonych lub skolonizowanych wieloopornymi drobnoustrojami lub o wysokim ryzyku wystąpienia HAI [16, 31]. W procesie nadzoru za szczególnie ważne uznano badania mikrobiologiczne [23, 29], co znalazło również odzwierciedlenie w obowiązujących w Polsce zapisach prawnych. Ustawy i rozporządzenia dotyczące tej kwestii określają między innymi: wymagania dotyczące laboratoriów mikrobiologicznych, zasady wykonywania badań sanitarno-epidemiologicznych w zakładach opieki zdrowotnej, rolę zarówno laboratorium mikrobiologicznego jak i diagnosty w procesie profilaktyki, monitorowania i ograniczania zakażeń, zwłaszcza u hospitalizowanych chorych. Mikrobiologia medyczna, obok diagnostyki medycznej, transfuzjologii i genetyki medycznej została uznana za priorytetową dziedzinę diagnostyki laboratoryjnej. Zostały określone standardy jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych ([http:// isap.sejm.gov.pl](http://isap.sejm.gov.pl)).

W ciągu ostatnich dziesięcioleci nie tylko znacznie zwiększyła się wiedza z zakresu epidemiologii zakażeń, ale przede wszystkim zdecydowanie zmienił się standard higieny szpitalnej. W szpitalach XIX wieku chirurdzy operowali w brudnych salach operacyjnych używając narzędzi zazwyczaj rzadko mytych między zabiegami. Zabiegi, ze względu na brak efektywnej anestezji, trwały krótko i ograniczały się najczęściej do amputacji kończyn. Wysoka śmiertelność operowanych była wynikiem szoku bólowego, wykrwawienia lub zakażenia. Nie myto rąk, nie mówiąc już o zakładaniu czystych fartuchów. Wiek XIX mimo to, został uznany za czas narodzin antyseptyki i aseptyki, a szczególnie ważny udział w zmianie spojrzenia na rolę higieny szpitalnej i edukację miała Florence Nightingale. Prowadząc badania w 1854 październiku i kwietniu 1855 dokonała skrupulatnej analizy śmiertelności wskazując na złe warunki sanitarne jako podstawową przyczynę zgonów. Badania te przekonały ówczesny rząd do reformy zdrowia i miały ogromny wpływ na poprawę sytuacji w szpitalach [27]. Pionierem aseptyki był angielski chirurg Joseph Lister, który opierając się na teorii Pasteura dotyczącej zarazków, w celu ograniczenia ryzyka zakażenia zastosował na sali operacyjnej kwas karbolowy (fenol). Lister założył, że rozpylenie fenolu wokół operowanego może zniszczyć bakterie obecne u pacjenta, personelu i na narzędziach a słuszność takiego założenia została potwierdzona spadkiem śmiertelności operowanych chorych z 46% w 1864 r. (początek stosowania fenolu) do 15%

w 1870 r. [43]. Zastosowana metoda miała jednak istotne skutki uboczne – fenol powodował oparzenia skóry i podrażnienia dróg oddechowych. Ponadto w 1881 roku Robert Koch opublikował wyniki swoich badań wskazujące na słabą aktywność fenolu wobec drobnoustrojów. W celu oceny tej aktywności Koch inkubował zawieszinę laseczek węgla z fenolem, przenosił niewielkie objętości mieszaniny do dużych objętości podłoża hodowlanego, unikając w ten sposób hamującej aktywności dezynfektantu i odczytywał wynik na podstawie obecności lub braku zmętnienia. Badania przeprowadzał także z wykorzystaniem spor bakteryjnych uzyskując je przez wysuszenie. Analizując aktywność fenolu i innych związków o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym stwierdził, że czas dezynfekcji jest zależny od stężeń preparatów. Prace Kocha stały się ważne nie tylko ze względu na poszukiwanie nowych dezynfektantów, ale przede wszystkim z powodu opracowania metod oceny ich aktywności [5]. Pionierem sterylizacji był francuski bakteriolog Charles Chamberland, który w 1880 roku skonstruował pierwszy sterylizator medyczny nazwany autoklawem Chamberlanda. Autoklaw ten przypominał współczesny szybkozawierający do gotowania narzędzi chirurgicznych, a w późniejszym czasie także opatrunków na rany oraz masek i rękawiczek chirurgów [5]. W przebiegu procesu nie uzyskiwano jednak eliminacji spor bakteryjnych. Robert Koch kontynuując badania nad sposobami niszczenia drobnoustrojów wraz z Gustawem Wolffhuglem skonstruował aparat na suche gorące powietrze uzyskując w nim temp. 140°C, a następnie we współpracy z Georgem Gaffkym i Friedrichem Loefflerem wykorzystał do sterylizacji parę wodną w ciśnieniu atmosferycznym i w nadciśnieniu. W swoich badaniach zastosował również tzw. „frakcjonowaną sterylizację” zgodną z założeniami Johna Tyndalla doceniając możliwość wykorzystania niższej temperatury do zniszczenia form przetrwalnikowych bakterii [5].

Od czasów Kocha nastąpił ogromny postęp w zakresie metod dekontaminacji. W celu ułatwienia doboru odpowiedniej metody, sprzęt i powierzchnie kontaktujące się z pacjentem skategoryzowano zgodnie ze stopniem ryzyka zakażenia związanego z użyciem danego sprzętu lub kontaktem z określoną powierzchnią (krytyczne, półkrytyczne i niekrytyczne). Zostały opracowane rekomendacje dotyczące kontroli środowiska [9], postępowania w sytuacji wystąpienia zakażeń/kolonizacji szczepami wieloopornymi [39], izolacji [38] oraz dezynfekcji i sterylizacji [35]. Wprowadzono szeroką gamę preparatów dezynfekcyjnych i nowe metody sterylizacji, w tym sterylizację niskotemperaturową z wykorzystaniem takich substancji jak tlenek etylenu, formaldehyd, kwas nadoctowy czy plazma [35]. Współcześnie proces sterylizacji jest walidowany a zagadnienia związane ze sterylizacją wyrobów medycz-

nych zostały zawarte w normach EN i ISO. Normy te określają między innymi warunki, jakie muszą być spełnione, aby oznakować narzędzie jako sterylne (EN 556) oraz ogólne warunki określające metody, walidację i rutynową kontrolę procesów sterylizacji (ISO 14 937). Ponadto opracowane zostały normy dotyczące najczęściej stosowanych wysokociśnieniowych sterylizatorów parowych (EN 285) i sterylizatorów na tlenek etylenu (EN 1422) wraz z walidacją i rutynową kontrolą tych procesów (odpowiednio: EN 554, EN 520). Stan taki pozwala do minimum zredukować ryzyko zakażenia związane z narzędziami i sprzętem stosowanym w zabiegach inwazyjnych. W pomieszczeniach wysoko aseptycznych zostały wprowadzone systemy wentylacji z filtrami HEPA, umożliwiające uzyskanie powietrza o wysokim stopniu czystości mikrobiologicznej. Z myślą o pacjentach w immunosupresji został opracowany przez Airinspace Technologies system oparty na tworzeniu wokół pacjenta komory ochronnej z 60-krotną wymianą powietrza w ciągu godziny i zastosowaniem plazmy jako czynnika niszczącego drobnoustroje [30].

Skuteczność dekontaminacji zależy od wielu czynników, w tym przede wszystkim od przestrzegania zaleceń dotyczących przeprowadzenia danego procesu. W dekontaminacji środowiska pacjenta szczególnie ważne są np. dokładność i zalecana częstość mycia i/lub dezynfekcji powierzchni. W badaniach obejmujących 1119 salach chorych w 23 szpitalach USA odpowiednią dekontaminację zaobserwowano tylko w 49% powierzchni ogółem a poniżej 30% w przypadku takich powierzchni jak uchwyty w toaletach, baseny, kaczki, klamki, kontakty [8]. Oddzielnym zagadnieniem jest powszechne pomijanie dekontaminacji stosowanego w szpitalach sprzętu elektronicznego, takiego jak komputery i telefony komórkowe i związane z tym ryzyko przenoszenia się drobnoustrojów [2].

W profilaktyce zakażeń szpitalnych szczególnie istotna jest higiena rąk. W 1829 francuski farmaceuta A.G. Labarraque zaobserwował odkażające właściwości roztworu zawierającego chlorek sodu i wapnia zalecając nawilżanie rąk tym preparatem lekarzom i wszystkim innym osobom kontaktującym się z zakażnie chorymi [5]. W 1846 roku węgierski położnik Ignaz Semmelweis pracując w Allgemeine Krankenhaus w Wiedniu dostrzegł związek między wysoką śmiertelnością położnic i niewystarczającą higieną rąk lekarzy odbierających poród. Lekarze, wcześniej uczestnicząc w sekcjach zwłok kobiet zmarłych z powodu gorączki połogowej, przed kontaktem z położnicami myli ręce wodą z mydłem, nie eliminowało to jednak nieprzyjemnego zapachu i, jak się później okazało, nie zapobiegało przenoszeniu się patogenów. Semmelweis w 1847 roku oprócz mycia proponował dodatkowo odkażanie rąk roztworami zawierającymi związku chloru, co w ciągu dwóch lat

pozwoili uzyskać spadek śmiertelności wśród położnic z 12% do 1% [49]. W ten sposób po raz pierwszy udowodniono istotne znaczenie dezynfekcji rąk w profilaktyce zakażeń szpitalnych. Mimo tak oczywistych wyników, dalszy rozwój w tej dziedzinie nastąpił dopiero w drugiej połowie XX wieku. W 1961 r. U.S. Public Health Service przygotował dla personelu służby zdrowia film szkoleniowy z demonstracją techniki mycia rąk. W 1975 r. i w 1985 r. CDC opublikowało wytyczne, zgodnie z którymi w większości przypadków wystarczające było mycie rąk zwykłym mydłem; mydło antybakteryjne zalecano przed i po wykonaniu inwazyjnej procedury, a antyseptyki na bazie alkoholu rekomendowano wyłącznie w sytuacji braku dostępu do umywalki [10]. Wytyczne opublikowane w 1995 roku przez Association for Professionals in Infection Control (APIC) rozszerzyły wskazania do dezynfekcji rąk. W aktualnych wytycznych standardem jest dezynfekcja rąk preparatem alkoholowym, natomiast mycie rąk pozostało tylko w szczególnych sytuacjach, np. przy ich wizualnie dostrzegalnym zabrudzeniu, lub w przypadku wysoce prawdopodobnego zanieczyszczenia rąk przetrwalnikami laseczek [10, 49]. Mimo rozpowszechnienia powyższych wytycznych i szerokiego panelu dostępnych antyseptyków, przestrzeganie przez personel szpitala zasad związanych z higieną rąk jest dalekie od oczekiwanego [10].

Podsumowując należy podkreślić, że XIX wiek i początek wieku XX, czas w którym żył i pracował Robert Koch, to początek ery profilaktyki zakażeń szpitalnych, która w obecnym kształcie może uczynić leczenie szpitalne bezpiecznym dla pacjenta. Czy jednak zakażenia szpitalne staną się przeszłością? Niestety nie jest to możliwe, ponieważ rozwój medycyny umożliwia utrzymanie przy życiu pacjentów skrajnie wrażliwych na zakażenie (noworodki i wcześniaki z niską wagą urodzeniową, osoby z wadami wrodzonymi skutkującymi immunosupresją), a ponadto znacznie poszerzył się panel możliwych do wykonania zabiegów inwazyjnych, nastąpił znaczny rozwój transplantologii, co również decyduje o zwiększonym ryzyku infekcji. Podobnie jak kiedyś, tak i dziś istnieje także czynnik ludzki – dostosowanie się do obowiązujących zasad profilaktyki, które w znacznej mierze może wpływać na odsetek notowanych zakażeń szpitalnych.

Piśmiennictwo

1. Amoores J., Ingram P.: Learning from adverse incidents involving medical devices. *Br. Med. J.* **325**, 272–275 (2002)
2. Borer A., Gilad J., Smolyakov S., Eskira S., Peled N., Porat N., Hyam E., Treffer R., Rieseberg K., Schlaeffer F.: Cell phones and *Acinetobacter* transmission. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1160–1161 (2005)
3. Bouza E., Hortal J., Muñoz P., Pascau J., Pérez M.J., Hiesmayr M.: European Study Group on Nosocomial Infections;

- European Workgroup of Cardiothoracic Intensivists: Postoperative infections after major heart surgery and prevention of ventilator-associated pneumonia: a one-day European prevalence study ESGNI-008). *J. Hosp. Infect.* **64**, 224–230, (2006)
4. Bouza E., San Juan R., Muñoz P., Voss A., Kluytmans J.: Co-operative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections: A European perspective on nosocomial urinary tract infections II. Report on incidence, clinical characteristics and outcome ESGNI-004 study). European Study Group on Nosocomial Infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 532–542 (2001)
 5. Brock T.D.: Sterilization, Disinfection, and other Techniques (w) Robert Koch: a life in medicine and bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, 1999, s. 105–114
 6. Byers K.E., Anglim A.M., Anneski C.J., Germanson T.P., Gold H.S., Durbin L.J., Simonton B.M., Farr B.M.: A hospital epidemic of vancomycin-resistant *Enterococcus*: risk factors and control. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **22**, 140–147 (2001)
 7. Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., Coque T.M.: Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Review. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** Suppl. 1, 144–153 (2008)
 8. Carling P.C., Parry M.M., Rupp M.E., Po J.L., Dick B., Von Behren S.M.: Improving Cleaning of the Environment Surrounding Patients in 36 Acute Care Hospitals. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **29**, 1035–1041 (2008)
 9. CDC. Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee HICPAC). *MMWR*, **52**, 1–44 (2003)
 10. CDC. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *MMWR*, **51**, 1–44 (2002)
 11. CDC. Transmission of hepatitis B virus among persons undergoing blood glucose monitoring in long-term-care facilities – Mississippi, North Carolina, and Los Angeles County, California, 2003–2004. *MMWR*, **54**, 220–223 (2005)
 12. Centers for Disease Control and Prevention. Bronchoscopy-related infections and pseudoinfections. *MMWR*, **48**, 557–560 (1999)
 13. Desenclos J.C., Bourdiol-Razes M., Rolin B., Garandeau P., Ducos J., Bréchet C., Thiers V.: Hepatitis C in a ward for cystic fibrosis and diabetic patients: possible transmission by spring-loaded finger-stick devices for self-monitoring of capillary blood glucose. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **22**, 701–707 (2001)
 14. Dudeck D.A., Pollock T.C. Horan: National Healthcare Safety Network (NHSN) report: Data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. *Am. J. Infect. Control.* **37**, 783–805 (2009)
 15. Farley J.E., Srinivasan A., Richards A., Song X., McEachen J., Perl T.M.: Handheld computer surveillance: shoe-leather epidemiology in the “palm” of your hand. *Am. J. Infect. Control.* **33**, 444–449 (2005)
 16. Furuno J.P., Perencevich E.N.: Identifying groups at high risk for carriage of antibiotic resistant bacteria. *Arch. Intern. Med.* **166**, 580–585 (2006) (wyżej cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
 17. Furuno J.P., Schweizer M.L., McGregor J.C., Perencevich E.N.: Economics of infection control surveillance technology: Cost-effective or just cost? *Am. J. Infect. Control.* **36**, S12–17 (2008)

18. Horan T.C., Dudeck M.A.: CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control.* **35**, 309–32 (2008)
19. Jarvis W.R.: Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Infect. Control.* **23**, 146–151 (1995)
20. Klevens R.M., Edwards J., Richards C., Horan T., Gaynes R., Pollock D., Cardo D.: Estimating Health Care-Associated Infections and Deaths in U.S. Hospitals, 2002. *Public Health Reports*, **122**, 160–166 (2007)
21. Lang C.J., Heckmann J.G., Neundorfer B.: Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants. *J. Neurol. Sci.* **160**, 128–139 (1998)
22. L'Héritau F., Alberti C., Cohen Y., Troché G., Moine P., Timsit J.F.: Nosocomial infection and multidrug-resistant bacteria surveillance in intensive care units: a survey in France. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **26**, 13–20 (2005)
23. McGowan J.E., Tenover F.C.: Confronting bacterial resistance in healthcare settings: a crucial role for microbiologists. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 251–258 (2004)
24. Miller M.A., Hyland M., Ofner-Agostini M., Gourdeau M., Ishak M.: Canadian Hospital Epidemiology Committee, Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program: Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile* associated diarrhea in Canadian hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23**, 137–140 (2002)
25. Muñoz P., Bouza E., San Juan R., Voss A., Pascau J., Desco M.: Co-Operative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI): Clinical-epidemiological characteristics and outcome of patients with catheter-related bloodstream infections in Europe (ESGNI-006 Study). *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 843–845 (2004)
26. Nelson D.B.: Infectious disease complications of GI endoscopy: part II, exogenous infections. *Gastrointest Endosc.* **57**, 695–711 (2003)
27. Pearson A.: Historical and changing epidemiology of health-care-associated infections. *J. Hosp. Infect.* **73**, 296–304 (2009)
28. Pegues D.A., Lasker B.A., McNeil M.M., Hamm P.M., Lundal J.L., Kubak B.M.: Cluster of cases of invasive aspergillosis in a transplant intensive care unit: evidence of person-to-person airborne transmission. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 412–416 (2002)
29. Peterson L.R., Hamilton J.D., Baron E.J., Tompkins L.S., Miller J.M., Wilfert C.M., Tenover F.C., Thomson R.B.: Role of clinical microbiology laboratories in the management and control of infectious diseases and the delivery of health care. Review. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 605–611 (2001)
30. Poirot J.L., Gangneux J.P., Fischer A., Malbernard M., Challer S., Laudinet N., Bergeron V.: Evaluation of a new mobile system for protecting immune-suppressed patients against airborne contamination. *Am. J. Infect. Control.* **35**, 460–466 (2007)
31. Pokorny L., Rovira A., Martin-Baranera M., Gimeno C., Alonso-Tarres C., Vilarasau J.: Automatic detection of patients with nosocomial infection by a computer-based surveillance system: a validation study in a general hospital. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **27**, 500–503. (2006)
32. Rosenthal V.D.: Central line-associated bloodstream infections in limited-resource countries: a review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1899–1907 (2009)
33. Rosenthal V.D., Maki D.G., Graves N.: The International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC): goals and objectives, description of surveillance methods, and operational activities. *Am. J. Infect. Control.* **36**, 1–12 (2008)
34. Rosenthal V.D., Pratesis R.D.: International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary for 2002–2007. *Am. J. Infect. Control.* **36**, 627–637 (2008) (wyżej cytowana praca jest dziełem 19 autorów)
35. Rutala W.A., Weber D.J.: Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC): Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008
36. Savey A, Simon F., Izopet J., Lepoutre A., Fabry J., Desenclos J.C.: A large nosocomial outbreak of hepatitis C virus infections at a hemodialysis center. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **26**, 752–760 (2005)
37. Schelenz S., French G.: An outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contamination of bronchoscopes and an endoscope washer-disinfector. *J. Hosp. Infect.* **46**, 23–30 (2000)
38. Siegel J.D., Rhinehard E., Jackson M., Chiarello L.: Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee: Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infections agents in healthcare settings, 2007 <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/isolation2007>
39. Siegel J.D., Rhinehart E., Jackson M., Chairello L.: Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee: Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings. 2006. <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf>
40. Singh N., Lortholary O.: Zygomycosis in solid organ transplant recipients: a prospective, matched case-control study to assess risks for disease and outcome. *J. Infect. Dis.* **15**, 1002–1011 (2009) (wyżej cytowana praca jest dziełem 29 autorów)
41. Stone P.W., Braccia D., Larson E.: Systematic Review of Economic Analysis of Health Care-Associated Infections. *Am. J. Infect. Control.* **33**, 501–509 (2005)
42. Suetens C., Morales I., Savey A., Palomar M., Hiesmayr M., Lepape A., Gastmeier P., Schmit J.C., Valinteliene R., Fabry J.: European surveillance of ICU-acquired infections (HELICS-ICU): methods and main results. *J. Hosp. Infect.* **65** Suppl 2, 171–173 (2007)
43. Tan S.Y., Tasaki A.: Joseph Lister (1827–1912): father of antisepsis. *Singapore Med. J.* **48**, 605–606 (2007)
44. Tugwell B.D., Patel P.R., Williams I.T., Hedberg K., Chai F., Nainan O.V., Thomas A.R., Woll J.E., Bell B.P., Cieslak P.R.: Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor. *Ann. Intern. Med.* **143**, 648–654 (2005)
45. Vaishnavi C.: Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Indian J. Med. Microbiol.* **27**, 289–300 (2009)
46. Wallace R.J., Brown B.A., Driffith D.E.: Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 453–490 (1998)
47. Weber D.J., Rutala W.A.: Lessons from outbreaks associated with bronchoscopy. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **22**, 403–408 (2001)
48. Wenzel R.P., Gennings C.: Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin. Infect. Dis.* **41** Suppl. 6S, 389–393 (2005)
49. WHO: WHO guidelines on hand hygiene in health care. First global patient safety challenge-clean care is safer care. Geneva: WHO 2009 http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597906_eng.pdf
50. Wilson J., Ramboer I., Suetens C.: HELICS-SSI working group: Hospitals in Europe Link for Infection Control through Surveillance (HELICS). Inter-country comparison of rates of surgical site infection-opportunities and limitations. *J. Hosp. Infect.* **65** Suppl. 2, 165–170 (2007)

Kwartalnik

Tom 49

Zeszyt 3 • 2010

CODEN:

PMKMAV 49 (3)

2010

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

<http://www.pm.microbiology.pl>

Urszula Guzik^{1*}, Danuta Wojcieszynska¹, Katarzyna Hupert-Kocurek¹

Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 576, email: biochem@us.edu.pl

Wpłynęło w lipcu 2010

1. Wprowadzenie. 2. Akceptory elektronów w beztlenowej degradacji arenów. 3. Mechanizmy degradacji związków aromatycznych w warunkach anoksji. 4. Podsumowanie

Microbiological degradation of aromatic compounds in anoxic conditions

Abstract: Microbiological degradation of aromatic compounds occurs via aerobic or anaerobic pathways. In anaerobic environments, arenes such as benzene, toluene, xylene, naphthalene, anthraquinone, phenols and its derivatives are degraded. In anoxic conditions ions of metals, sulphate, nitrate or simple organic compounds are final electron acceptors in arene degradation. Key intermediate in these processes is benzoyl-CoA, which can be transformed to acetyl-CoA. The obtained acetyl-CoA is included in central metabolism. Degradation of aromatic compounds is also observed in methanogenic conditions. The products fermentation of aromatic compounds are acetate, butyrate, carbon dioxide and hydrogen, which can be degraded in syntrophic bacterial consortium.

1. Introduction. 2. Electron acceptors in anoxic degradation of arenes. 3. Mechanisms of degradation of aromatic compounds in anoxic conditions. 4. Summary

Słowa kluczowe: enzymy, immobilizacja, mikroorganizmy, związki aromatyczne

Key words: enzymes, immobilisation, microorganisms, aromatic compounds

1. Wprowadzenie

Węglowodory aromatyczne są grupą związków szeroko rozpowszechnionych w środowisku. Ich źródłem są rośliny, reakcje geochemiczne, działalność wulkaniczna, przede wszystkim jednak działalność człowieka, objawiająca się wzmożonym spalaniem węgla, ropy naftowej, rozwojem przemysłu farmaceutycznego, chemicznego czy stosowania nawozów sztucznych. Działalność ta przyczyniła się w ostatnich dziesięcioleciach do gwałtownego wzrostu obecności tych związków w środowisku. Rozwój zainteresowań mechanizmami biodegradacji związków aromatycznych przeprowadzonymi przez mikroorganizmy, wynika z faktu wzrastającego zanieczyszczenia środowiska oraz stwierdzonego mutagennego i kancerogennego ich działania [6, 19, 23, 25, 33, 42, 49, 62].

Głównym problemem w degradacji węglowodorów aromatycznych jest przewyższenie chemicznej stabilności struktury pierścienia aromatycznego. Przez długi okres czasu katabolizm węglowodorów aromatycznych uważany był za proces wyłącznie tlenowy, gdyż we wszystkich znanych szlakach tlenowej degradacji związków aromatycznych to właśnie molekularny tlen jako kosubstrat służy mikroorganizmom do początkowego ataku na pierścień aromatyczny i do rozerwania jego struktury. Jednak w ostatnich latach zaobserwo-

wano, że istnieją mikroorganizmy zdolne do metabolizowania węglowodorów aromatycznych w warunkach beztlenowych. Mikroorganizmy takie musiały zatem rozwinąć alternatywne, tlenowo niezależne szlaki metaboliczne [1]. Jednakże należy zaznaczyć, że większość wielocyklicznych i wysoko spolimeryzowanych związków aromatycznych może być degradowana tylko w warunkach tlenowych [25, 35, 39, 41, 44, 62].

Degradacja jednopierścieniowych związków aromatycznych w warunkach beztlenowych, w większości przypadków, przebiega poprzez benzoilo-CoA, który następnie ulega przekształceniu do acetylo-CoA [6, 20, 35, 39, 49]. Dla rozkładu policyklicznych węglowodorów aromatycznych kluczową reakcją jest karboksylacja [43].

Ponieważ węglowodory aromatyczne są związkami bardziej zredukowanymi niż produkty ich rozkładu, podczas ich utlenienia wymagana jest obecność akceptorów elektronów o wyższym potencjale redox, co pozwala mikroorganizmom na przekształcanie energii niezbędnej do wzrostu. Wszystkie wyizolowane dotychczas szczepy bakterii zdolne do rozkładu tych związków w warunkach beztlenowych należą do bakterii denitryfikacyjnych, żelazowych, siarczanowych, beztlenowych bakterii fotosyntetyzujących oraz bakterii fermentujących. Spośród grzybów zdolnych do rozkładu policyklicznych węglowodorów aromatycznych

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii; ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 2009 576; e-mail: urszula.guzik@us.edu.pl

(PAHs), o niskich masach cząsteczkowych, w warunkach anoksji należą *Aspergillus* sp., *Trichocladium canadense* oraz *Fusarium oxysporum*. Ponadto *T. canadense*, *Aspergillus* sp. oraz *Verticillium* sp. i *Acremonium* sp. degradują PAHs o dużych masach cząsteczkowych [62]. Beztlenowe oddychanie w środowisku naturalnym zachodzi tylko w głębokich warstwach, które pozbawione są tlenu, akceptora elektronów o najwyższym potencjale redox ($E_0' = +818$ mV) [25, 39, 42, 43, 52, 62]. Wysokość tego potencjału niejako narzuca kolejność wykorzystywania przez bakterie ostatecznych akceptorów elektronów. W środowisku beztlenowym jest nim ten dostępny jon, którego wartość potencjału redox jest najwyższa [25, 42, 52].

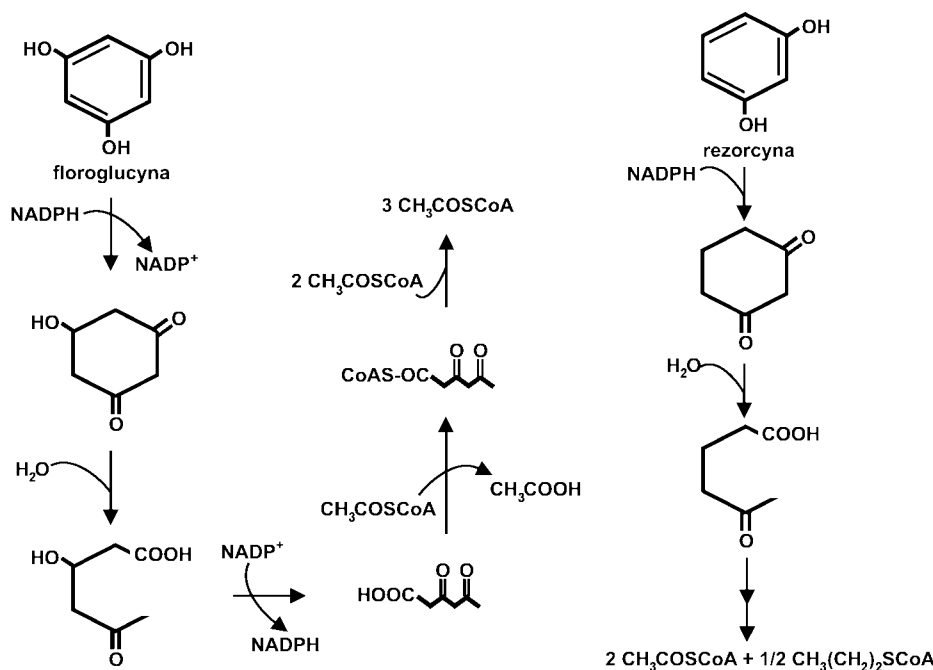
2. Akceptory elektronów w beztlenowej degradacji arenów

Bakterie denitryfikujące są często spotykanymi mikroorganizmami zdolnymi do rozkładu związków aromatycznych [1, 2, 25, 30, 52, 58]. Do niedawna uważano, że wszystkie one należą do β -podklasy proteobakterii, gdyż większość wyizolowanych gatunków należy do rodzaju *Thauera* i *Azoarcus* [7, 29, 31, 35, 39, 61]. Ponadto opisano również jeden gatunek, spoza rodzajów *Thauera* i *Azoarcus*, zdolny do rozkładu kwasu benzoowego – *Alcaligenes xylosoxidans* należący jednak do tej samej podklasy. Wyjątkiem jest szczep *Bacillus cereus* zdolny do rozkładu benzenu w warunkach redukcji azotanów [30]. Bakterie denitryfikujące przeprowadzają rozkład większości jednopierścieniowych związków aromatycznych poprzez

benzoilo-CoA. Jednakże kilka aromatycznych substratów, które posiadają dwie lub więcej grup hydroksylowych w pozycji *meta*, degradowane są do acetylo-CoA z pominięciem etapu aktywacji pierścienia aromatycznego [7, 33, 35, 39]. Drogi takie opisano dla rozkładu rezorcyny i floroglucyny, co przedstawiono na rys. 1.

Niektóre związki aromatyczne, wśród nich uchlорowane pochodne benzenu, są bardzo odporne na biodegradację przez bakterie denitryfikujące. Chociaż wydaje się, że związki te podlegają rozkładowi w warunkach denitryfikacji, to do tej pory nie udało się wyizolować czystych kultur zdolnych do ich rozkładu. Możliwym jest, że związki te do rozkładu wymagają obecności syntroficznych konsorcji bakteryjnych [39, 41].

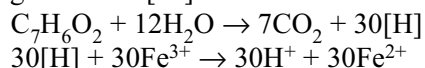
W warunkach oddychania azotanowego może zachodzić również biodegradacja policyklicznych węglowodorów aromatycznych. Wyizolowane szczepy NAP-3-1 oraz NAP-4 posiadają zdolność biodegradacji naftalenu. Szczep NAP-3-1, należący do γ -podklasy proteobakterii, jest filogenetycznie blisko spokrewniony z *Pseudomonas* sp. U przedstawicieli tej rodziny stwierdzono już wcześniej zdolność degradacji antracenu, fenantrenu, pirenu, naftalenu, a wyizolowane szczepy przeprowadzające te reakcje zidentyfikowano jako *P. stutzeri*, *P. putida* oraz *P. fluorescens* [53]. Wyniki te sugerują, że inni przedstawiciele *Pseudomonadaceae* są również zdolni do biodegradacji policyklicznych węglowodorów aromatycznych w warunkach beztlenowych. Wyizolowany NAP-4 należy również do podklasy γ -proteobakterii, jednak filogenetycznie jest blisko spokrewniony z *Vibrio* spp. Na podstawie tych danych można przypuszczać, że filogenetycznie różne bakterie z γ -podklasy proteobakterii mogą przeprowa-



Rys. 1. Drogi beztlenowej degradacji floroglucyny i rezorcyny

dzać degradację naftalenu i innych związków aromatycznych w warunkach beztlenowych [59].

Redukcja jonów żelaza (III), manganu (IV), wana-du (V), chromu (VI) czy uranu (VI) jest ważnym alternatywnym szlakiem oddychania beztlenowego i może łączyć się z jednoczesnym utlenieniem związków aromatycznych [18, 42]. Znanych jest obecnie wiele bakterii oddychania żelazowego. *Geobacter metallireducens* jest bakterią zdolną do całkowitego utleniania toluenu, fenolu, *p*-krezolu, benzoesanu, aromatycznych aldehydów i alkoholi z jednoczesną redukcją jonów żelaza (III) [9, 16, 17, 33, 39, 52]. Utlenienie benzoesanu w obecności jonów Fe(III) przebiega według równania [39]:

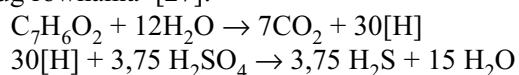


Stwierdzono również, że liczni przedstawiciele rodziny *Geobacteraceae* w osadzie o dużej zawartości związków aromatycznych są w stanie przeprowadzać biodegradację benzenu [3]. Zdolność do całkowitego utlenienia fenolu i kwasu benzoesowego stwierdzono również u przedstawiciela termofilnych archebakterii *Ferroglobus placidus*. Szczep ten przeprowadza także redukcję jonów żelaza (III), gdy źródłem elektronów jest benzaldehyd, kwas 4-hydroksybenzoesowy, *p*-hydroksybenzaldehyd czy kwas cynamonowy [63].

Osady mangrowe są źródłem konsorcjum bakteryjnego zdolnego do rozkładu takich PAHs jak fluoren, fenantren, fluorofenantren i piren w obecności jonów żelaza (III) [23, 50]. Ch a n g i wsp. wykazali jednak, że w osadach mangrowych następuje szybsza degradacja w obecności siarczanów, słabsza w warunkach metanogenezy, a w obecności azotanów dochodzi do inhibicji rozkładu m.in. nonylofenolu [23].

Bakterie redukujące siarczany są grupą organizmów przeprowadzających biodegradację bardzo szerokiej gamy związków aromatycznych. Stwierdzono zdolność do utleniania przez mieszane kultury bakterii siarczanowych tak opornych na rozkład związków jak benzen, fenol, ksyleny, naftalen, 2-metylonaftalen, kwasy 1- i 2-naftalenokarboksyłowe czy fenantren [4, 5, 8, 13, 23, 25, 26, 39, 50, 52, 54, 56, 57, 60, 64]. Intermediatem w degradacji związków monoaromatycznych przez bakterie oddychania siarczanowego jest benzoilo-CoA. Gatunki przeprowadzające procesy rozkładu arenów z siarczanami, jako ostatecznymi akceptorami elektronów, należą do *Desulfobacteriaceae* z podklasy γ -proteobakterii lub do Gram dodatnich *Desulfotomaculum* [49].

Degradację benzoesanu opisano dotychczas tylko u szczepu *Desulfonema magnum* i przebiega ona według równania [27]:



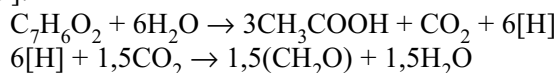
Desulfobacterium (*Db.*) *aniline* degraduje anilinę i fenol, *Db. phenolicum* fenol, 4-hydroksybenzoesan

i *p*-krezol, *Db. catecholicum* katechol, a *Db. indolicum* indol. *Desulfococcus multivorans* i *Desulfosarcina variabilis* mogą rozkładać fenylooctan, a szczepy z rodzaju *Desulfobacterium* i *Desulfococcus* 3-aminobenzoesan i hydrochinon. *Desulfotomaculum* sp., jako źródło węgla i energii, wykorzystuje katechol, fenol, *p*- i *m*-krezol, alkohol benzylowy i wanilinę [39, 51]. Toluenu degradowany jest przez *Desulfobacula toluolica* [9, 39]. Stwierdzono również, że bakterie oddychania siarczanowego rozkładają *o*- i *m*-ksylen [55, 57]. Z kolei Galushko i wsp. wyizolowali z morskiego osadu szczep NaphS2, filogenetycznie blisko spokrewniony z rodziną *Desulfobacteriaceae* i przeprowadzający degradację naftalenu [36].

Jako akceptory elektronów w procesach degradacji struktury aromatycznej mogą występować związki o podobnej strukturze do rozkładanego związku. Przykładem może być redukcyjna dechlorynacja polichlorowanych bifenyli, podczas której dochodzi do redukcji takich związków jak: inne bifenyly, 2,6-dibromobifenyl, halo benzoesany, chlorobenzeny i chlorofenole [42, 44].

Fotosyntetyzujące bakterie purpurowe do wzrostu wykorzystują światło i anaerobiozę. W tych warunkach nie uzyskują one energii z utleniania związków organicznych, które stanowią dla nich źródło protonów. Są one uzyskiwane podczas degradacji związków aromatycznych do acetylo-CoA, który następnie służy im jako źródło węgla.

Utlenienie benzoesanu przebiega według równania [39]:

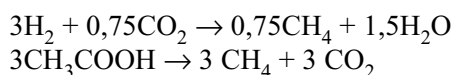


Zdolność do fotoorganotroficznego utleniania związków aromatycznych stwierdzono u *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodomicrobium vannielii*, *Rhodospirillum fulvum*, *Rhodocyclus purpureus*, *Rhodocyclus gelatinosus*. U *Rhodopseudomonas palustris* i *Rhodomicrobium vannielii* stwierdzono zdolność do rozkładu benzoesanu, 4-hydroksybenzoesanu, protokatecholu, niektórych fenyłowych i hydroksyfenyłowych kwasów tłuszczowych, a nawet uchlorowcowanych pochodnych benzenu [39, 41].

Bakterie fermentujące związki aromatyczne są filogenetycznie heterogenne i należą do dwóch grup. Bakterie te wykorzystują węglowodory aromatyczne jako źródło węgla i energii, przekształcając je w produkty fermentacji, takie jak octan lub maślan, dwutlenek węgla i wodór, które następnie są dalej degradowane w syntroficznych konsorcjach bakteryjnych [6, 24]. Na przykład całkowita mineralizacja benzoesanu przebiega w dwóch etapach. Pierwszy prowadzony jest przez bakterie fermentujące według równania:



Dalsze reakcje przeprowadzają metanogeny według reakcji [39]:



Procesy degradacji węglowodorów aromatycznych w warunkach metanogenezy często przebiegają intensywnie w obecności dodatkowych źródeł węgla, np. glukozy, celulozy czy kwasów huminowych [6, 23, 42, 52].

W metanogennych warunkach stwierdzono również ograniczoną biodegradację wielopierścieniowych związków aromatycznych takich jak naftalen, 1- i 2-metylnaftalen, bifenyl, 2,6-dimetylnaftalen, antrachinon, heksadekan [28, 37]. Opisano również czyste kultury bakterii fermentujących związki aromatyczne. Szczepy z rodzaju *Clostridium* i *Coprococcus* sp., *Eubacterium oxidoreducens*, *Pelobacter acidigallici* i *Pelobacter massiliensis* fermentują aromatyczne substraty zawierające dwie lub trzy grupy hydroksylowe w pozycji *meta*, takie jak rezorcyna czy floroglucyna. Związki te są tak silnie utlenione, że mogą być fermentowane do kwasów organicznych [35, 39].

3. Mechanizmy degradacji związków aromatycznych w warunkach anoksji

Większość mikroorganizmów nie jest zdolna do całkowitej degradacji jednopierścieniowych związków aromatycznych, ale katalizują one tlenowo niezależne reakcje biotransformacji tych związków. Podczas tych procesów pierścień aromatycznych nie podlega rozszczepieniu, a przekształceniom ulegają jedynie podstawniki pierścienia. W ten sposób związki te są przekształcane do kilku podstawowych produktów, takich jak benzoesan, hydroksybenzoesan, fenol, krezol czy toluen. Produkty te stanowią dalej substraty dla organizmów przeprowadzających degradację pierścienia aromatycznego. Reakcje biotransformacji obejmują utlenienie i redukcję podstawników pierścienia, rozerwanie wiązania węgiel-węgiel pomiędzy pierścieniem aromatycznym a podstawnikiem, reakcje dekarboksylacji, usunięcia grup O-metylowych oraz usunięcia z podstawników atomów siarki i azotu [30, 33, 39, 41, 49].

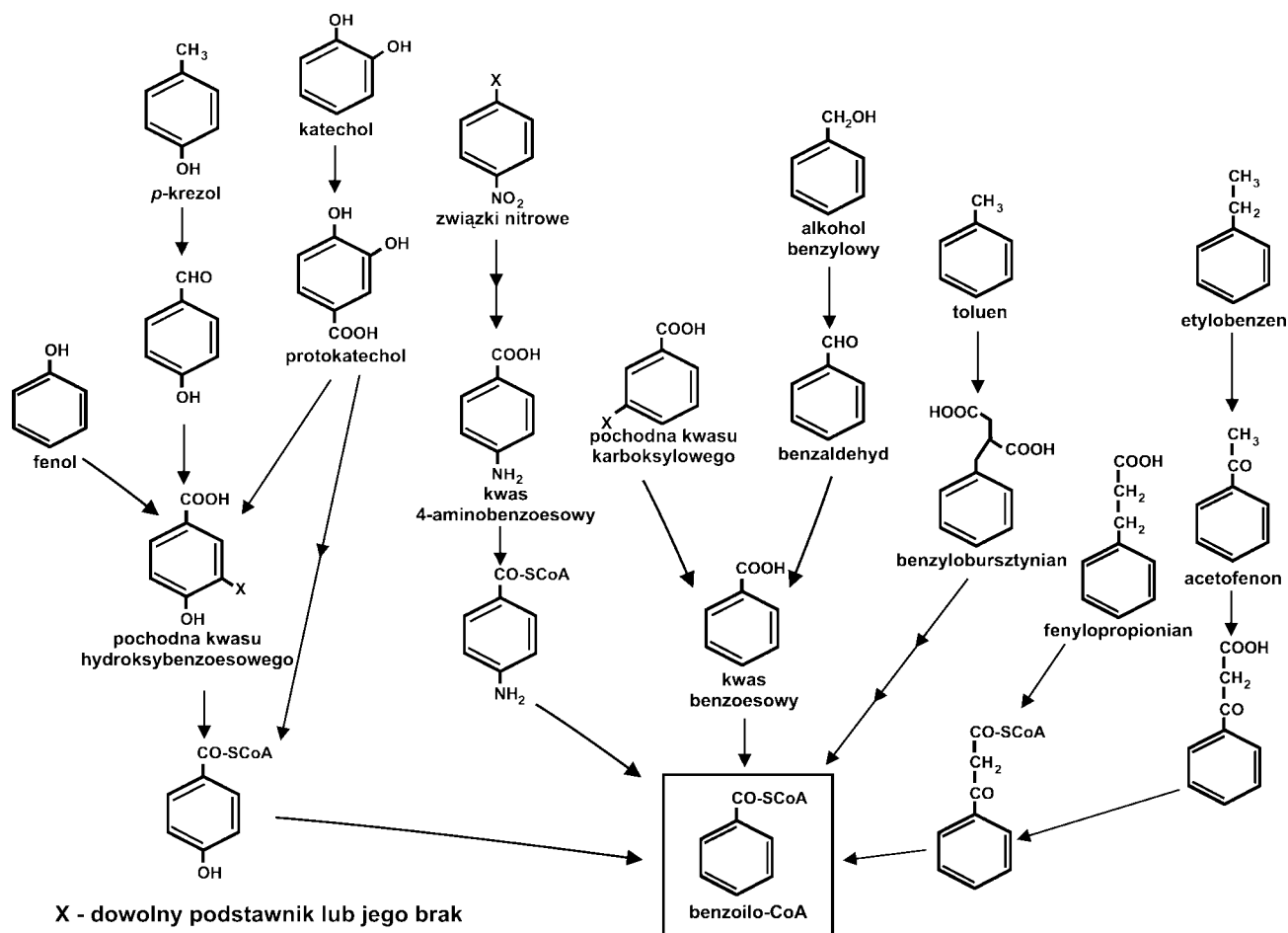
Beztlenowa degradacja jednopierścieniowych związków aromatycznych przebiega w dwóch etapach. W fazie pierwszej aromatyczne substraty są przekształcane do jednego centralnego intermediatu, który następnie podlega redukcijnej dearomatyzacji. Dla większości węglowodorów aromatycznych tym centralnym intermediatem jest benzoilo-CoA, a tylko dla kilku hydroksylowanych arenów są to floroglucyna i rezorcyna [6, 13, 39, 49]. Reakcje łączące rozkład związków aromatycznych z głównym intermediatem benzoilo-CoA przedstawia rysunek 2 [19, 20]. Druga faza beztlenowej degradacji polega na redukcji tych intermediatów do acyklicznych związków, które następnie degrado-

wane są do acetylo-CoA i dwutlenku węgla. Znany jest przypadek, opisany u bakterii denitryfikującej *Alcaligenes* sp., bezpośredniej dearomatyzacji i hydrolytycznego rozcięcia pierścienia aromatycznego [39].

Jednopierścieniowe związki aromatyczne z trzema grupami hydroksylowymi w pozycji *meta* są degradowane bez aktywacji z udziałem CoA. Ponieważ substraty te są bardziej utlenione niż związki aromatyczne pozbawione podstawników, mogą one być degradowane przez bakterie oddychania beztlenowego lub też bakterie fermentujące, np. *Pelobacter*, *Eubacterium* czy *Clostridium*. Bakterie fermentujące nie mineralizują związków aromatycznych całkowicie, a tylko akumulują octan lub maślan jako ostateczny produkt. Związkami przekształcanymi do floroglucyny i rezorcyny są di-, tri- i tetrahydroksybenzoesan oraz kwas trihydroksygalowy. Degradacja floroglucyny jest inicjowana przez NADPH-zależną reduktazę floroglucynową, enzym wrażliwy na tlen wyizolowany z komórek szczepu *Eubacterium oxidoreducens* i prowadzi do powstania 1,3-dioksy-5-hydroksycykloheksanu, co przedstawiono na rysunku 1. Pierścień tego związku podlega hydrolytycznemu otwarciu przez hydrolazę dihydrofloroglucynową do kwasu 3-hydroksy-5-oksoheksanowego, który następnie ulega utlenieniu do trójoctanu przez NADP⁺ zależną dehydrogenazę. Trójoctan aktywowany przez transferazę CoA zależną od acetylo-CoA podlega tiolitycznemu rozcięciu na trzy cząsteczki acetylo-CoA [20, 35, 38, 39].

Degradacja rezorcyny może być inicjowana przez bezpośrednią redukcję pierścienia aromatycznego do 1,3-dioksycykloheksanu, który hydrolizowany jest do alifatycznego kwasu 5-oksoheksanowego. Podlega on dalszej degradacji do acetylo-CoA i butyrylo-CoA szlakiem β -oksydacji [39]. Przebieg reakcji przedstawia rysunek 1.

Fenol może być degradowany beztlenowo przez większość denitryfikujących, siarkowych oraz żelazowych bakterii oraz metanogenne konsorcja. Metaboliczny szlak rozkładu tego związku został zbadany i opisany u szczepu *Thauera aromatica*. Szczep ten wykorzystuje fenol jako substrat wzrostowy, wymaga jedynie obecności w środowisku dwutlenku węgla, gdyż prowadzony przez niego szlak inicjowany jest karboksylacją w pozycji *para* pierścienia, co prowadzi do powstania kwasu 4-hydroksybenzoesowego. Przemianę tą przedstawiono na rysunku 2. Kwas 4-hydroksybenzoesowy jest aktywowany przez specyficzną ligazę koenzymu A, opisaną dla szczepów *Thauera aromatica* i *Rhodopseudomonas palustris*. 4-hydroksybenzylo-CoA jest następnie redukowany do benzylo-CoA przez reduktazę 4-hydroksybenzylo-CoA, enzym silnie wrażliwy na tlen i otrzymany z komórek *Thauera aromatica*, *Azoarcus evansii* oraz *Rhodopseudomonas palustris* [7, 29, 39, 61]. Oba te enzymy obecne są



Rys. 2. Benzoilo-CoA jako centralny intermediat beztlenowej degradacji arenów

wyłącznie w komórkach rosnących beztlenowo, dla których substratem wzrostowym jest kwas 4-hydroksybenzoesowy lub inne związki aromatyczne, których rozkład przebiega przez ten intermediat.

Do rozkładu toluenu zdolne są bakterie siarczane, żelazowe i denitryfikacyjne należące do β i γ podklas proteobakterii oraz metanogenne konsorcja [4, 9, 10, 45]. Mineralizacja toluenu polega na przekształceniu go do benzoenu lub benzoilo-CoA, który podlega reakcjom dearomatyzacji, a następnie degradacji acyklicznych intermedatów. Badania nad szlakiem rozkładu toluenu przez bakterie, zostały przeprowadzone na szczepach *Thauera aromatica* i *Azoarcus* sp. Pierwszą reakcją tego szlaku jest reakcja addycji fumaranu do toluenu, prowadząca do powstania benzylobursztynianu [4, 10, 22, 45, 48]. Reakcję tę katalizuje syntaza benzylobursztynianowa, enzym silnie wrażliwy na tlen i podlegający odwracalnej inhibicji przez analogi substratu takie jak alkohol benzylowy, benzaldehyd czy fenylohydrazynę. Enzym ten zawiera w centrum aktywnym rodnik glicynowy i katalizuje powstanie rodnika benzylowego poprzez odłączenie atomu wodoru od grupy metylowej toluenu. Rodnik ten przyłącza się do podwójnego wiązania węgiel-węgiel fumaranu,

w wyniku czego tworzy się rodnik benzylobursztynianowy [41]. Syntaza benzylobursztynianowa jest dawcą wodoru dla tego rodnika, w wyniku czego powstaje benzylobursztynian z jednoczesnym odtworzeniem rodnikowej formy enzymu. Na podstawie badań przeprowadzonych na *T. aromatica* stwierdzono, że transferaza benzylobursztyniło-CoA jest enzymem indukowanym obecnością benzylobursztynianu [47]. Utlenienie benzylobursztynianu do benzoilo-CoA przebiega szlakiem analogicznym do β -oksydacji kwasów tłuszczowych, co przedstawiono na rysunku 3 [41, 48].

Niektórzy autorzy uważają, że intermediaty tego szlaku, kwas benzylobursztynianowy, jak również fenyloitakonylo-CoA, są metabolitami toksycznymi dla komórek bakteryjnych [27]. Podczas procesu biodegradacji toluenu może dochodzić do reakcji acetylo-CoA z grupą metylową tego związku, w wyniku czego powstaje fenylopropionilo-CoA. Jest on przekształcany w szlaku β -oksydacji do benzoilo-CoA [10, 27].

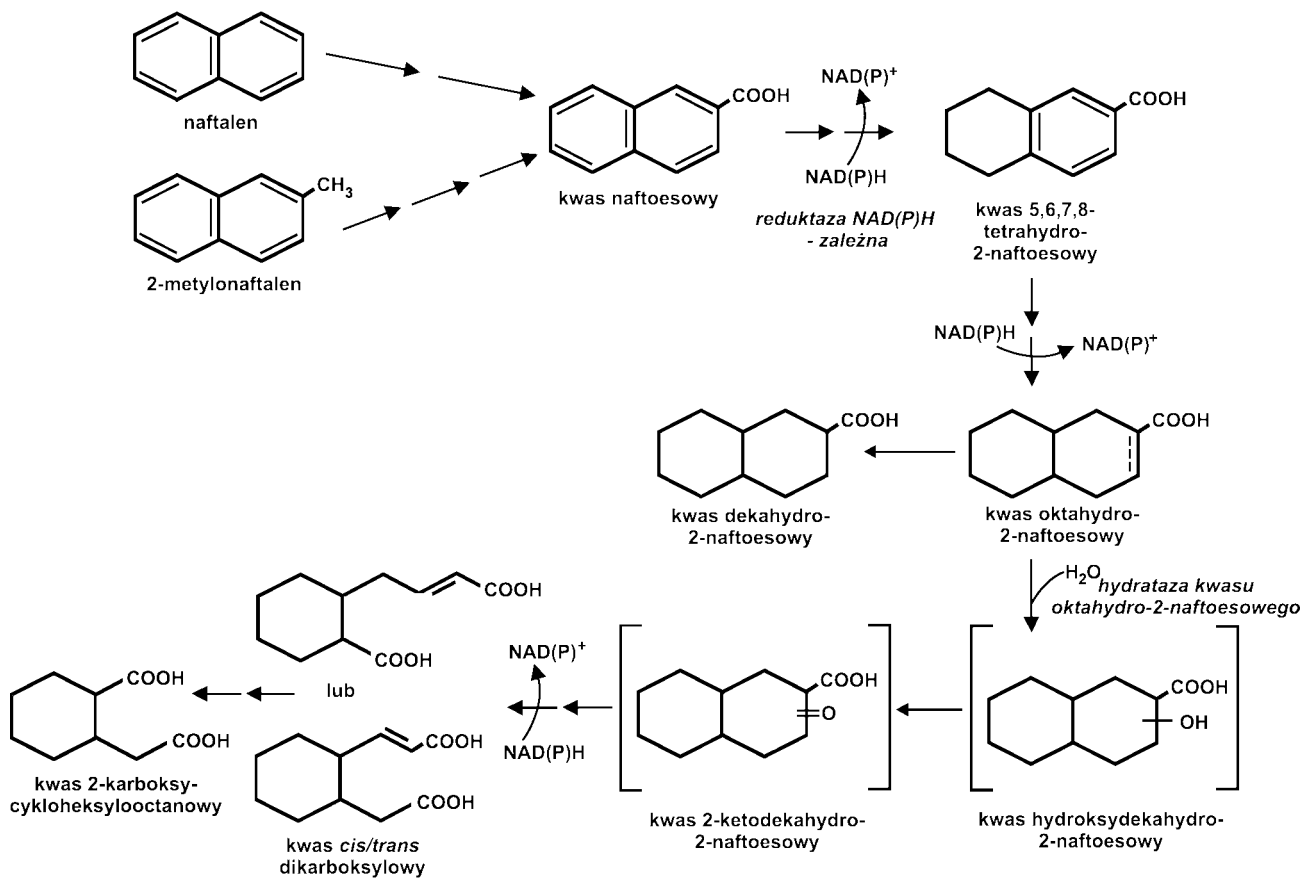
Proponuje się również istnienie szlaków rozkładu toluenu poprzez jego *para*-hydroksylację do *p*-krezolu lub hydroksylację jego grupy metylowej z alkoholem benzylowym jako intermediatem, co przedstawiono na rysunku 3 [10, 34]. Prawdopodobnie grupa

hydroksylowa wbudowywana w procesie hydroksylacji pochodzi z wody. Zaobserwowano u szczepu *Geobacter metallireducens* GS-15 *para*-hydroksylację oraz hydroksylację grupy metylowej, podczas gdy bakterie siarczanowe i de nityfikujące przeprowadzają jedynie drugą reakcję, w której kluczowymi intermediatami są alkohol benzylový oraz benzaldehyd, a dla jej funkcjonowania niezbędna jest aktywność czterech enzymów, to jest metylohydroksylazy toluenowej, dehydrogenazy alkoholu benzylového oraz benzaldehydu i syntetazy benzoilo-CoA [27, 34].

Benzoilo-CoA jest głównym i ostatnim aromatycznym intermediatem w procesach beztlenowej biodegradacji większości jednopierścieniowych związków aromatycznych. Istnieją dwa alternatywne szlaki rozkładu benzoilo-CoA, opisane u fototroficznej bakterii *Rhodospseudomonas palustris* oraz denityfikującej bakterii *T. aromatica*. Reakcja dearomatyzacji pierścienia w warunkach anoksji polega na jego redukcji do cykloheksa-1,5-dien-1-karboksy-CoA przez reduktazę benzoilo-CoA [14, 15, 19, 33, 38]. Reduktaza benzoilo-CoA jest enzymem silnie wrażliwym na tlen. Jest to heterotetramer zawierający w swojej budowie dwa centra żelazowo-siarkowe typu (Fe₄S₄), dwa centra żelazowo-siarkowe typu (Fe₂S₂) oraz FAD. Redukcja wszystkich substratów prowadzona przez ten enzym

jest ściśle powiązana z hydrolizą dwóch cząsteczek ATP do ADP i P_i na mol substratu [13, 39]. Produkt redukcji benzoilo-CoA podlega następnie hydratacji i dehydrogenacji u *Thauera aromatica* przypuszczalnie do 2-okso-6-hydroksycykloheksano-1-karboksy-CoA [39, 46]. Natomiast szczep *R. palustris* przeprowadza dodatkową redukcję cyklicznego dienu do cykloheks-1-en-1-karboksy-CoA [32, 38, 46]. 2-oksy-6-hydroksycykloheksano-1-karboksy-CoA podlega hydrolitycznemu otwarciu pierścienia aromatycznego i prowadzi do powstania 3-hydroksypimelino-CoA. Ulega on dalej β-oksydacji do acetylo-CoA oraz glutarylo-CoA. Dehydrogenaza glutarylo-CoA, opisana u *Azoarcus evansii*, katalizuje utlenienie i dekarboksylację glutarylo-CoA do dwutlenku węgla i krotonylo-CoA, który następnie utleniany jest do dwóch cząsteczek acetylo-CoA (rys. 3) [11, 19, 29, 38, 39, 40, 46].

Aromatyczne węglowodory pozbawione podstawników, takie jak naftalen czy fenantren, są ekstremalnie trudnymi związkami w procesach biodegradacji. Wykazano jednak, że mogą ulegać degradacji przez beztlenowe mikroorganizmy oddychania żelazowego, azotanowego i siarczanowego oraz konsorcja metanogenne [24]. Kluczową reakcją rozpoczynającą degradację naftalenu i fenantrenu jest karboksylacja. Prowadzi ona do utworzenia analogów kwasu benzoesowego,



Rys. 4. Redukcyjny szlak kwasu naftoesowego

odpowiednio kwasu 2-naftoesowego oraz kwasu fenantrenowego, które są idealnymi substratami dla reakcji aktywacji cząsteczką CoA oraz ich dalszych przemian [1, 4, 21, 54, 64]. Stwierdzona obecność naftalenolu w niektórych hodowlach bakterii siarczanych może świadczyć, że organizmy te mogą przeprowadzać biodegradację naftalenu również innym szlakiem, w którym pierwszą reakcją jest hydroksylacja, a nie karboksylacja [8, 21].

Beztlenowa degradacja metylonaftalenu jest procesem analogicznym do rozkładu toluenu i innych metylowanych pochodnych benzenu. Pierwsza reakcja katalizowana przez syntazę 2-naftylobursztynianową podobnie polega na addycji fumaranu do grupy metylowej 2-metylnaftalenu [4, 12, 21]. Powstały w jej wyniku 2-naftylobursztynian ulega aktywacji przez transferazę bursztynylo-CoA zależną od CoA prowadząc do utworzenia 2-naftylobursztynylo-CoA. Kolejne reakcje prowadzą przez szlak β -oksydacji aż do utworzenia centralnego intermediatu, to jest naftalenoilo-CoA.

Ostatnie doniesienia wskazują, że naftalen i kwas 2-naftoesowy mogą być redukowane do kwasu 5,6,7,8-tetrahydro-2-naftoesowego, który jest także metabolitem degradacji tetraliny. Kwas ten może podlegać dalszej redukcji do kwasu oktahydro-2-naftalenokarboksylowego. W wyniku jego hydratacji powstaje kwas hydroksydekahydro-2-naftoesowy, który to ulega utlenieniu do kwasu 2-oksodekahydro-2-naftoesowego. Tiolityczne rozszczepienie pierścienia, a następnie reakcje β -oksydacji prowadzą do powstania kwasu *cis*-2-karboksycykloheksylooctowego [5]. Proponowany przebieg tego szlaku przedstawiono na rysunku 4.

4. Podsumowanie

Wzrastające zanieczyszczenie środowiska naturalnego wpłynęło pozytywnie na rozwój badań związanych z degradacją związków aromatycznych zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. W warunkach anoksji rozkład arenów przebiega zarówno w procesach związanych z przekazywaniem elektronów na ostateczny akceptor, którym mogą być jony metali, siarczany, azotany, czy też proste związki organiczne, jak i w procesach fermentacji metanowej. Najczęściej w mikrobiologiczne procesy rozkładu w warunkach beztlenowych zachodzą poprzez benzoilo-CoA jako kluczowy metabolit, którego dalsze przekształcenia prowadzą do utworzenia metabolitów centralnych przemian komórkowych. Dokładne poznanie procesów biodegradacji węglowodorów aromatycznych w warunkach anoksji może być lekarstwem dla zdegradowanych środowisk, które mają ograniczony dostęp powietrza lub których napowietrzanie jest trudne i nieekonomiczne, może przyczynić się do ich szybszej bioremediacji.

Piśmiennictwo

1. Ambrosoli R., Petruzzelli L., Minati J.L., Marsan F.A.: Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. *Chemosphere*, **60**, 1231–1236 (2005)
2. An Y., Joo Y., Hong I., Ryu H., Cho K.: Microbial characterization of toluene-degrading denitrifying consortia obtained from terrestrial and marine ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 611–619 (2004)
3. Anderson R.T., Rooney-Varga J.N., Gaw C.V., Lovley D.R.: Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1222–1229 (1998)
4. Annweiler E., Materna A., Safinowski M., Kappler A., Richnow H.H., Michaelis W., Meckenstock R.U.: Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5329–5333 (2000)
5. Annweiler E., Michaelis W., Meckenstock R.U.: Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 852–858 (2002)
6. Bajaj M., Gallert C., Winter J.: Treatment of phenolic wastewater in an anaerobic fixed bed reactor (AFBR) – Recovery after shock loading. *J. Hazard. Mater.* **162**, 1330–1339 (2009)
7. Barragan M.J.L., Blaquez B., Zamarro M.T., Mancheno J.M., Garcia J.L., Diaz E., Carmona M.: BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.* **280**, 10683–10694 (2005)
8. Bedessem M.E., Swoboda-Colberg N.G., Colberg P.J.S.: Naphthalene mineralization coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**, 213–218 (1997)
9. Beller H.R., Spormann A.M., Sharma P.K., Cole J.R., Reinhard M.: Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1188–1196 (1996)
10. Beller H.R., Spormann A.M.: Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* **179**, 670–676 (1997)
11. Blaquez B., Carmona M., Garcia J.L., Diaz E.: Identification and analysis of a glut aryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environ. Microbiol.* **10**, 474–482 (2008)
12. Boll M., Fuchs G., Heider J.: Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 604–611 (2002)
13. Boll M., Fuchs G.: Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* **234**, 921–933 (1995)
14. Boll M.: Dearomatizing benzene ring reductases. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 132–142 (2005)
15. Boll M.: Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalyzing Birch-like reductions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1701**, 34–50 (2005)
16. Botton S., Parsons J.R.: Degradation of BTEX compounds under iron-reducing conditions in contaminated aquifer microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 2630–2638 (2006)

17. Butler J.E., He Q., Nevin K.P., He Z., Zhou J., Lovley D.R.: Genomic and microarray analysis of aromatic degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. *BMC Genomics*, **8**, 180 (2007)
18. Carmona M., Diaz E.: Iron-reducing bacteria unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Mol. Microbiol.* **58**, 1210–1215 (2005)
19. Carmona M., Zamarro M.T., Blazquea B., Durante-Rodriguez G., Juarez J.F., Valderrama J.A., Barragan M.J.L., Garcia J.L., Diaz E.: Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 71–133 (2009)
20. Chakraborty R., Coates J.D.: Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 437–446 (2004)
21. Chakraborty R., Coates J.D.: Hydroxylation and carboxylation – two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *Dechloromonas* strain RCB. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5427–5432 (2005)
22. Chakraborty R., O'Connor S.M., Chan E., Coates J.D.: Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8649–8655 (2005)
23. Chang B.V., Lu Z.J., Yuan S.Y.: Anaerobic degradation of nonylphenol in subtropical mangrove sediments. *J. Hazard. Mater.* **165**, 162–167 (2009)
24. Chang W., Um Y., Holoman T.R.P.: Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. *Biotechnol. Lett.* **28**, 425–430 (2006)
25. Chen K.F., Kao C.H.M., Chen C.H.W., Surampalli R.Y., Lee M.S.: Control of petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater by intrinsic and enhanced bioremediation. *J. Environ. Sci.* **22**, 846–871 (2010)
26. Coates J.D., Woodward J., Allen J., Philp P., Lovley D.R.: Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3589–3593 (1997)
27. Coschigano P.W., Young L.Y.: Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 652–660 (1997)
28. de Vasconcelos S.P., Angolini C.F.F., Garcia I.N.S., Dellagnezze B.M., da Silva C.C., Marsaioli A.J., dos Santos Neto E.V., de Oliveira V.M.: Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Org. Geochem.* **41**, 675–681 (2010)
29. Ding B., Schmeling S., Fuchs G.: Anaerobic metabolism of catechol by the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* – a result of promiscuous enzymes and regulators? *J. Bacteriol.* **190**, 1620–1630 (2008)
30. Dou J., Ding A., Liu X., Du Y., Deng D., Wang J.: Anaerobic benzene biodegradation by a pure bacterial culture of *Bacillus cereus* under nitrate reducing conditions. *J. Environ. Sci.* **22**, 709–715 (2010)
31. Duldhardt I., Nijehuis I., Schauer F., Heipieper H.J.: Anaerobically grown *Thauera aromatica*, *Desulfococcus multivorans*, *Geobacter sulfurreducens* are more sensitive towards organic solvents than aerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 705–711 (2007)
32. Eglund P.G., Pelletier D.A., Dispensa M., Gibson J., Harwood C.S.: A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Microbiology*, **94**, 6484–6489 (1997)
33. Foght J.: Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospect. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 93–120 (2008)
34. Frazer A.C., Coschigano P.W., Young L.Y.: Toluene metabolism under anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*, **1**, 293–303 (1995)
35. Fuchs G.: Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *N.Y. Acad. Sci.* **1125**, 82–99 (2008)
36. Galushko A., Minz D., Schink B., Widdel F.: Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. *Environ. Microbiol.* **1**, 514–420 (1999)
37. Genthner B.R.S., Townsend G.T., Lantz S.E., Mueller J.G.: Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote under anaerobic enrichment conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**, 99–105 (1997)
38. Harwood C.S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G.: Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 439–458 (1999)
39. Heider J., Fuchs G.: Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe*, **3**, 1–22 (1997)
40. Heider J., G. Fuchs i wsp.: Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch. Microbiol.* **170**, 120–131 (1998)
41. Heider J., Spormann A.M., Beller H.R., Widdel F.: Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 459–473 (1999)
42. Hong Y., Gu J.D.: Bacterial anaerobic respiration and electron transfer relevant to the biotransformation of pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **63**, 973–980 (2009)
43. Karthikeyan R., Bhandari A.: Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: a review. *J. Hazard. Subst. Res.* **3**, 1–19 (2001)
44. Krumins V., Park J.W., Son E.K., Rodenburg L.A., Kerkhof L.J., Haggblom M.M., Fennell D.E.: PCB dechlorination enhancement in Anacostia River sediment microcosms. *Water Res.* **43**, 4549–4558 (2009)
45. Kube M., Heider J., Amann J., Hufnagel P., Kuhner S., Beck A., Reinhardt R., Rabus R.: Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **181**, 182–194 (2004)
46. Laempe D., Jahn M., Fuchs G.: 6-hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* **263**, 420–429 (1999)
47. Leuthner B., Heider J.: Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* operon codes for enzymes of β oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J. Bacteriol.* **182**, 272–277 (2000)
48. Leutwein Ch., Heider J.: Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and β -oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology*, **145**, 3265–3271 (1999)
49. Leven L., Schnurer A.: Molecular characterization of two anaerobic phenol-degrading enrichment cultures. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* (2010), doi: 10.1016/j.ibiod.2010.04.009
50. Li C.H.H., Wong Y.S., Tam N.F.Y.: Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with amendment of iron(III) in mangrove sediment slurry. *Bioresour. Technol.* (2010), doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.005

51. Li T., Bisailon J.-G., Villemur R., Letourneau L., Bernerd K., Lepine F., Beaudet R.: Isolation and characterization of a new bacterium carboxylating phenol to benzoic acid under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* **178**, 2551–2558 (1996)
52. Luo H., Liu G., Zhang R., Jin S.: Phenol degradation in microbial fuel cells. *Chem. Eng. J.* **147**, 259–264 (2009)
53. McNally D.L., Mihelcic J.R., Lueking D.R.: Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2633–2639 (1998)
54. Meckenstock R.U., Annweiler E., Michaelis W., Richnov H.H., Schink B.: Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2743–2747 (2000)
55. Morasch B., Annweiler E., Warthmann R.J., Meckenstock R.U.: The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites: degradation of naphthalene, *o*-, and *m*-xylene by sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **44**, 183–191 (2001)
56. Morasch B., Meckenstock R.U.: Anaerobic degradation of *p*-xylene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Curr. Microbiol.* **51**, 127–130 (2005)
57. Morasch B., Schink B., Tebbe C.C., Meckenstock R.U.: Degradation of *o*-xylene and *m*-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch. Microbiol.* **181**, 407–417 (2004)
58. Rabus R.: Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 580–587 (2005)
59. Rockne K.J., Chee-Sanford J.C., Sanford R.A., Hedlund B.P., Staley J.T., Strand S.E.: Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1595–1601 (2000)
60. Safinowski M., Meckenstock R.U.: Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Environ. Microbiol.* **8**, 347–352 (2006)
61. Schie van P.M., Young L.Y.: Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2432–2438 (1998)
62. Silva I.S., Grossman M., Durrant L.R.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under micro aerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **63**, 224–229 (2009)
63. Tor J.M., Lovley D.R.: Anaerobic degradation of aromatic compounds couples to Fe(III) reduction by *Ferroglobus placidus*. *Environ. Microbiol.* **3**, 281–287 (2001)
64. Zhang X., Young L.Y.: Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4759–4764 (1997)

Spis treści

KONFERENCJA NAUKOWA „MIKROBIOLOGIA 100 LAT PO ROBERCIE KOCHU”

Z. Zwolska – Koch i jego dokonania – rys historyczny	139
E. Augustynowicz-Kopeć, Z. Zwolska – Postępy w diagnostyce i epidemiologii molekularnej <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	151
M. Binek – Spojrzenie na postulaty Kocha po stu latach od śmierci ich twórcy	157
R. Gierczyński – Diagnostyka i molekularna epidemiologia <i>Bacillus anthracis</i> ...	165
B. Sadowska, B. Różalska – Gronkowce – na co jeszcze je stać?	173
A. Budkowska, P. Maillard, F. Roohvand – Poszukiwanie nowych sposobów zapobiegania zakażeniu wirusem zapalenia wątroby typu C	179
E. Samorek-Salamonowicz, J.S. Niczyporuk – Wirus Zachodniego Nilu oraz inne nowo pojawiające się zagrożenia zdrowia publicznego	187
S. Tylewska-Wierzbanowska, T. Chmielewski – Zoonozy przenoszone przez kleszcze na terenie Polski	191
A. Lipińska, K. Bieńkowska-Szewczyk – Nowe szczepionki przeciw herpeswirusom i wektory herpeswirusowe w terapii człowieka	199
M. Fleischer – Profilaktyka zakażeń szpitalnych w czasach Kocha i dziś	209
U. Guzik, D. Wojcieszewska, K. Hupert-Kocurek – Mikrobiologiczny rozkład związków aromatycznych w warunkach anoksji	217

Contents

SCIENTIFIC CONFERENCE “MICROBIOLOGY 100 YEARS AFTER ROBERT KOCH”

Z. Zwolska – Robert Koch and their achievements – a history	139
E. Augustynowicz-Kopeć, Z. Zwolska – Progress in diagnosis and epidemiology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	151
M. Binek – A glance at Koch’s postulates 100 years after his death	157
R. Gierczyński – Diagnostics and molecular epidemiology of <i>Bacillus anthracis</i>	165
B. Sadowska, B. Różalska – Staphylococci – what’s new about them?	173
A. Budkowska, P. Maillard, F. Roohvand – Quest for new ways to prevent Hepatitis C virus infections	179
E. Samorek-Salamonowicz, J.S. Niczyporuk – West Nile virus other emerging threats to public health	187
S. Tylewska-Wierzbanowska, T. Chmielewski – Tick-borne zoonoses occurring in Poland	191
A. Lipińska, K. Bieńkowska-Szewczyk – Novel antiherpesviral vaccines and herpesviral vectors for human therapy	199
M. Fleischer – Nosocomial infection prophylaxis in Koch’s time and today	209
U. Guzik, D. Wojcieszewska, K. Hupert-Kocurek – Microbiological degradation of aromatic compounds in anoxic conditions	217

